THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

par

Jean-Daniel EHRHARDT

Ingénieur E. N. S. C. S.

RECHERCHES SUR LA BIOSYNTHESE DES PHYTOSTEROLS

Soutenue le 4 Novembre 1969 devant la commission d'examen

MM.	G. OURISSON	Président
	L. HIRTH	Membre du jury
	J.F. BIELLMANN	Membre du jury
	J. SCHWARTZ	Membre invité

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES PHYSIQUES

par

Jean-Daniel EHRHARDT

Ingénieur E. N. S. C. S.

RECHERCHES SUR LA BIOSYNTHESE DES PHYTOSTEROLS

Soutenue le 4 Novembre 1969 devant la commission d'examen

MM.	G. OURISSON	Président
	L. HIRTH	Membre du jury
	J.F. BIELLMANN	Membre du jury
	J. SCHWARTZ	Membre invité

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNIVERSITE DE STRASBOURG
FACULTE DES SCIENCES

Edition de MAI 1969

Doyen: Professeur J.H. VIVIEN

Doyens Honoraires: A. KIRRMANN, P. LACROUTE, H.J. MARESQUELLE, G. MILLOT

Professeurs Honoraires: P. DE BEAUCHAMP, L. BOISSELET, H.CARTAN, G. CERF, C. CHABAUTY, A. CHRETIEN, J. DENY, Ch. EHRESMANN, M. FRECHET, Mle S. GILLET, A. HEE, R. HOCART, A. KIRRMANN, G. LEMEE, P. L'HERITIER, A. LICHNEROWICZ, L. NEEL, Ch. SADRON, E. TERROINE, H. VILLAT, H. WEISS, E. WOLFF, J. YVON.

Maitre de Conférences Honoraire: R. WEIL.

Professeurs:

H.J. MARESQUELLE	T.	Biologie végétale
H. FORESTIER	T.	Chimie générale
J. ROTHE	T.	Physique du Globe
P. LACOUTE	T.	Astronomie
J.H. VIVIEN	T.	Zoologie et Embryologie expérimentale
A. MAILLARD	T.	Physicochimie du Pétrole
S. GORODETZKY	T.	Physique générale et Physique nucléaire
L. SACKMANN	T.	Mécanique des Fluides
J. BYE	T.	Chimie Physique
R. LOMBARD	T.	Chimie organique
Mle M.PEREY	T.	Chimie nucléaire
S. GOLDSZTAUB	T.	Minéralogie et Petrographie
P. JOLY	T.	Biologie Générale
H. BENOIT	T.	Physicochimie macromoléculaire
P. CUER	T.	Physique générale et Physique corpusculaire
G. MILLOT	T.	Géologie et Paléontologie
R. LECOLAZET	T.T.P.	Physique du Globe
H. SAUCIER	T.T.P.	Minéralogie
R. ROHMER	T.	Chimie minérale
Mle A. GAGNIEU	T.T.P.	Botanique
S. NIKITINE	T.	Physique générale
F. STUTINSKY	T.	Physiologie générale
B. WURTZ	T.T.P.	Chimie biologique
J. BRENET	T.	Electrochimie
G. OURISSON	T.T.P.	Chimie
A. COCHE	T.T.P.	Physique nucléaire
R. CERF	T.	Physique générale
J. FRENKEL	T.T.P.	Mathématiques
P. TAGLANG	T.	Physique
J.P. LONCHAMP	T.T.P.	Physique
A. DELUZARCHE	T.T.P.	Chimie
J.B. DONNET	T.T.P.	Chimie Physique
R. ARMBRUSTER	T.T.P.	Physique
A. ROCHE	T.T.P.	Physique du Globe
L. HIRTH	T.	Microbiologie
A. SIGOT	P.S.C.	Zoologie
A. FUCHS	T.	Mécanique rationnelle
A. GALLMANN	T.T.P.	Physique
P. MIALHE	T.T.P.	Physiologie animale
J.P. EBEL	T.	Chimie biologique

J. PARROD	T.T.P.	Chimie
R. WEY	T.T.P.	Chimie
Mme D. MAGNAC	T.T.P.	Physique
M. DAUNE	P.S.C.	Physique
J.P. ADLOFF	T.T.P.	Chimie nucléaire
D. BERNARD	T.T.P.	Méthodes mathématiques de la physique
E. DANIEL	T.	Physique expérimentale
P. CHEVALLIER	T.	Physique
J. GREMILLARD	T.T.P.	Mécanique des Fluides
P. CARTIER	T.	Mathématiques
G. REEB	T.	Topologie
R. CHAUVIN	T.	Psychophysiologie
J. WUCHER	P.S.C.	Physique
Mme M. BRINI	P.S.C.	Chimie
R. BARO	P.S.C.	Physique
H. DURANTON	P.S.C.	Botanique
R. WEISS	T.T.P.	Chimie
P. FEDERLIN	T.T.P.	Chimie
J. LERAY	P.S.C.	Physique
J.P. SCHWING	P.S.C.	Chimie
M. SIESKIND	P.S.C.	Physique
G. MONSENEGO	T.	Physique théorique
P. GABRIEL	T.T.P.	Mathématiques
C. WIPPLER	T.	Physicochimie des Hauts Polymères ind.
P.A. MEYER	T.T.P.	Mathématiques
G. WEILL	P.S.C.	Physique
J.M. BLOCH	T.	Chimie
A. CLAUSS	P.S.C.	Chimie
E. FOLLENIUS	P.S.C.	Zoologie
J. LUCAS	P.S.C.	Géologie
J.J. THIEBOLD	P.S.C.	Biologie animale
G. GLAESER	T.	Mathématiques
J.H. WEIL	P.S.C.	Chimie biologique
D. FOATA	P.S.C.	Mathématiques

Professeurs associés:

A. BANDERET (E.A.H.P.) - R. CLELAND (Physique) - G. PEROLD (Chimie) - J. SAMPSON (Mathématiques) -

Maitres de Conférences:

H. DANAN	Physique
Mme Chr. WINTER	Physique
J.P. EBERHART	Minéralogie
Mme D. CAGNIANT	Chimie
X. FERNIQUE	Mathématiques
J. STREITH	Chimie
F. GAUTIER	Physique propédeutique
G. SUTTER	Physique électronique
J.M. LEHN	Chimie

Cl. ROBERT ..... Physique
Fr. LACROUTE ..... Biologie végétale
A. GIRARDIE ..... Biologie animale
M. GOUNOT ..... Botanique
J. DEHAND ..... Chimie minérale
J. PRADINES ..... Mathématiques
F. BECKER ..... Physique mathématique
M. KAROUBI ..... Mathématiques
A. MIGNOT ..... Mathématiques appliquées
R. GERARD ..... Mathématiques
J. ROUX ..... Botanique
R. VOLTZ ..... Physique théorique
A. MICHARD ..... Géologie
J.M. GIRAUD ..... Mathématiques
Y. BOULANGER ..... Chimie biologique
D. DACUNHA-CASTELLE ..... Mathématiques
J.P. BRETAGNOLLE ..... Mathématiques
J.J. RIEHL ..... Chimie
Cl. DELACHERIE ..... Mathématiques

Maîtres de Conférences associés:

V. AVANISSIAN (Mathématiques) - J. APSIMON (Chimie) - R. CAIROLI (Mathématiques) - E. DADE (Mathématiques) - H. GOLDWHITE (Chimie) - G. LETTA (Mathématiques) - G. RINEHART (Mathématiques) - M. NIKOLIC (Physique corpusculaire) -

Secrétaire général de la Faculté: G. SAINT-PE.

A MA FEMME

A MES PARENTS

En reconnaissance
de tous leurs sacrifices

A MONSIEUR LE PROFESSEUR OURISSON

A MONSIEUR LE PROFESSEUR HIRTH

Ils ont inspiré et guidé ce travail.

Qu'ils veuillent bien trouver dans ces pages le témoignage de ma très vive gratitude et de tout mon respect.

A MESSIEURS P.BENVENISTE, R.BRANDT, R.PRYCE et P.SCHAEFFER

En témoignage de mon attachement et de toute mon amitié.

A MESDEMOISELLES A.DURR et P.FUND

Je les remercie très vivement de l'aide qu'elles ont bien voulu m'apporter.

AVANT - PROPOS

Le travail présenté ici a été entrepris en vue d'étudier la biosynthèse des phytostérols dans diverses espèces végétales. Nous avons tenté d'une part d'identifier le précurseur triterpénique (lanostérol ou cycloarténol), d'autre part de déterminer les intermédiaires entre ce précurseur et les stérols.

Dans l'Introduction, nous rappellerons les connaissances actuelles sur la biosynthèse du cholestérol chez les animaux, nous indiquerons les principaux travaux effectués sur les phytostérols et nous parlerons brièvement des travaux chimiques effectués sur les tissus végétaux cultivés in vitro.

Dans le Chapitre I, nous étudierons les triterpènes, précurseurs possibles des stérols, dans diverses espèces végétales (plantes et tissus cultivés in vitro).

Dans le Chapitre II, nous exposerons les résultats de nos incorporations de lanostérol et de cycloarténol radioactifs.

Dans le Chapitre III, nous décrirons l'effet de certains inhibiteurs sur la biosynthèse des stérols.

Les résultats obtenus justifient complètement l'hypothèse d'une intervention, dans les plantes, du cycloarténol et non du lanostérol comme précurseur des stérols.

INTRODUCTION

I . LA BIOSYNTHESE DU CHOLESTEROL 1.

La biosynthèse des stérols, et essentiellement du cholestérol, a fait l'objet de nombreuses études dans les tissus animaux en raison du rôle primordial qu'ils y jouent (précurseurs des hormones stéroides, des acides biliaires, etc...).

Il est connu depuis longtemps (1-3) que l'acide acétique est un précurseur des stérols avec comme étapes intermédiaires le squalène 2 et le lanostérol 3a. Nous ne parlerons pas ici des transformations de l'acide acétique en squalène.
La conversion de ce dernier en cholestérol se fait en 3 séries d'étapes distinctes :

- époxydation
- cyclisation
- déméthylations, migrations et réductions de doubles liaisons.

I.1 EPOXYDATION ET CYCLISATION DU SQUALENE.

On a longtemps admis que la cyclisation était induite par l'attaque du squalène par un équivalent de l'ion "OH^+", qui serait elle-même suivie d'une série de cyclisations concertées et de migrations de méthyles et d'hydrogènes. Suivant le ou les systèmes enzymatiques présents, qui conditionnent la conformation initiale du squalène, on peut obtenir les différentes séries de triterpènes tétra- et pentacycliques.
Chez les animaux la seule série triterpénique connue est celle du lanostane 4 , dont le précurseur postulé est le protostane 5.
Chez les champignons, on n'a longtemps connu que les acides polyporéniques (série du lanostane), puis ont été mis en évidence des produits de la série du protostane tels l'acide fusidique 13a (4), la céphalosporin P1

13b (5), l'acide helvolique 14 (6).
Chez les végétaux, outre la très grande variété de triterpènes pentacycliques, on connaît plusieurs séries tétracycliques: lanostane, cycloartane 6, euphane 7, dammarane 8, cucurbitane 9. De plus, la série du protostane est représentée par les alisols isolés de Alisma plantago (7). Tous ces produits dérivent du squalène par des mécanismes identiques; seule la conformation initiale du squalène diffère, donnant ainsi lieu aux diverses séries.

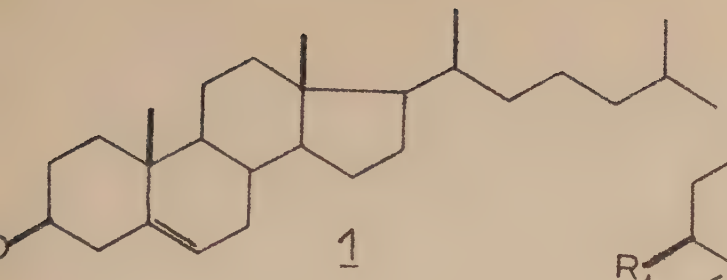
La voie de cyclisation mettant en jeu une attaque du squalène par "OH^+" a d'abord été mise en doute par BARTON et coll. (8) qui ont observé que le lanostadiène-8,24 3b était métabolisé en lanostérol, avec un très faible rendement cependant (0,08%), par Saccharomyces cerevisiae. Ces auteurs ont admis que l'attaque du squalène pouvait se faire par l'équivalent biogénétique de l'ion H^+ pour donner le lanostadiène qui serait ensuite hydroxylé en 3. Ce mécanisme est plausible, car BARTON a aussi montré (9) que le fernène-9 10 de Polypodium vulgare dérive directement du squalène. De même CASPI a étudié (10) la formation du tétrahymanol 11 de Tétrahymena piriformis et a trouvé qu'elle provenait d'une attaque du squalène par un ion H^+ suivie d'une hydroxylation nucléophile terminale par l'eau (Tableau I).

Mais c'est grâce aux travaux de COREY et de van TAMELEN que la voie principale de la biosynthèse du cholestérol chez les animaux a été élucidée: le squalène est transformé en époxy-2,3 squalène 12 et c'est ce produit qui se cyclise sous l'action de H^+ (Tableau I)

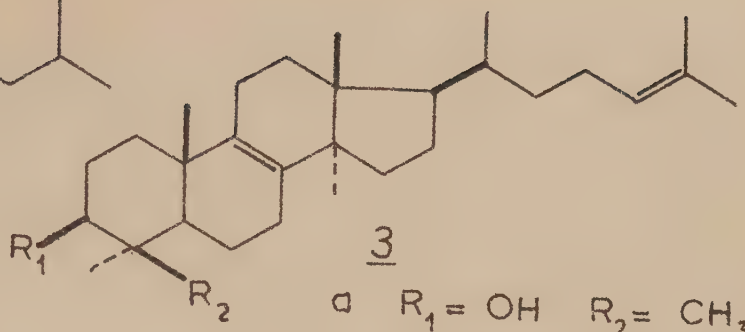
Un certain nombre de résultats ont permis de prouver ce mécanisme:

- En aérobiose, l'époxyde de squalène est métabolisé avec un excellent rendement en cholestérol par un homogénat de foie de rat, alors qu'en anaérobiose, on s'arrête au lanostérol qui a le même degré d'oxydation que le produit de départ (11,12).

- Si on incube du squalène marqué et de l'époxyde de squalène non actif avec un homogénat de foie de rat, on peut isoler de l'époxyde marqué (dilution isotopique) (11,12).



1

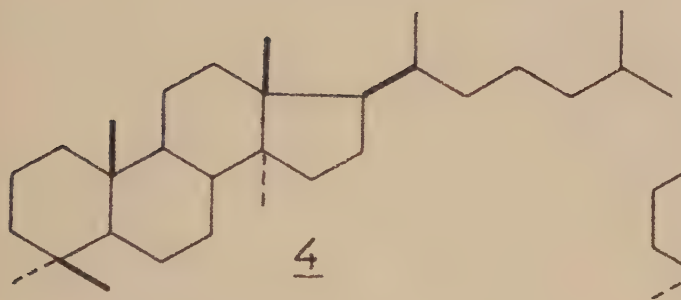


3

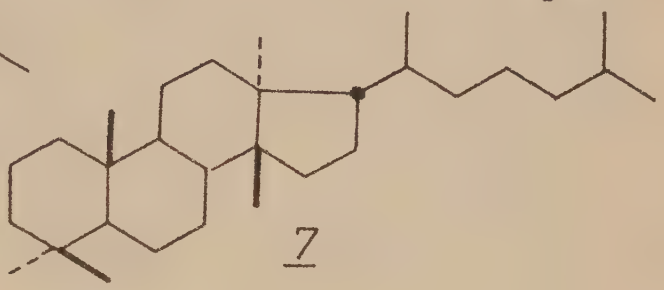
a R_1 = OH R_2 = CH_3

b R_1 = H R_2 = CH_3

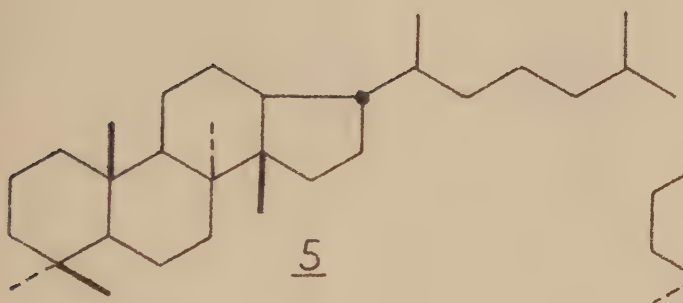
c R_1 = OH R_2 = H



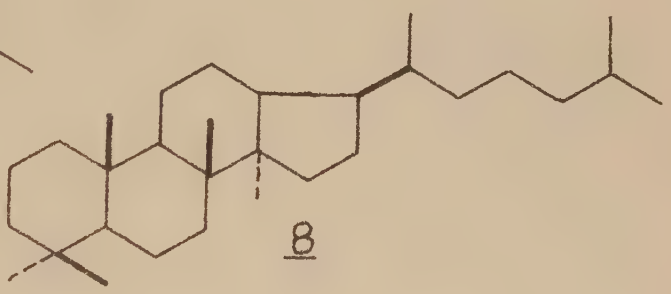
4



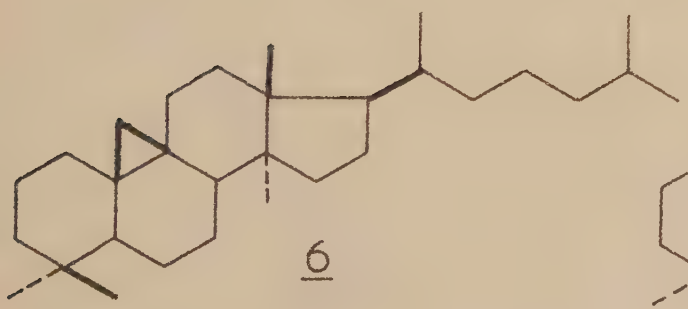
7



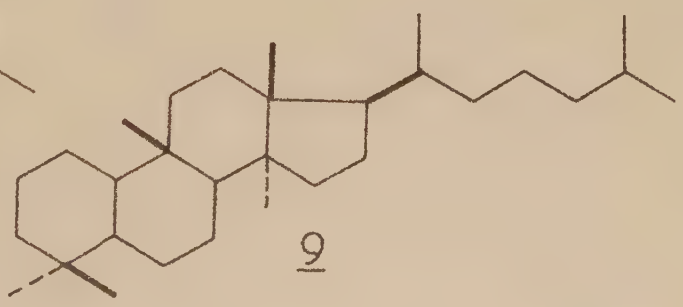
5



8

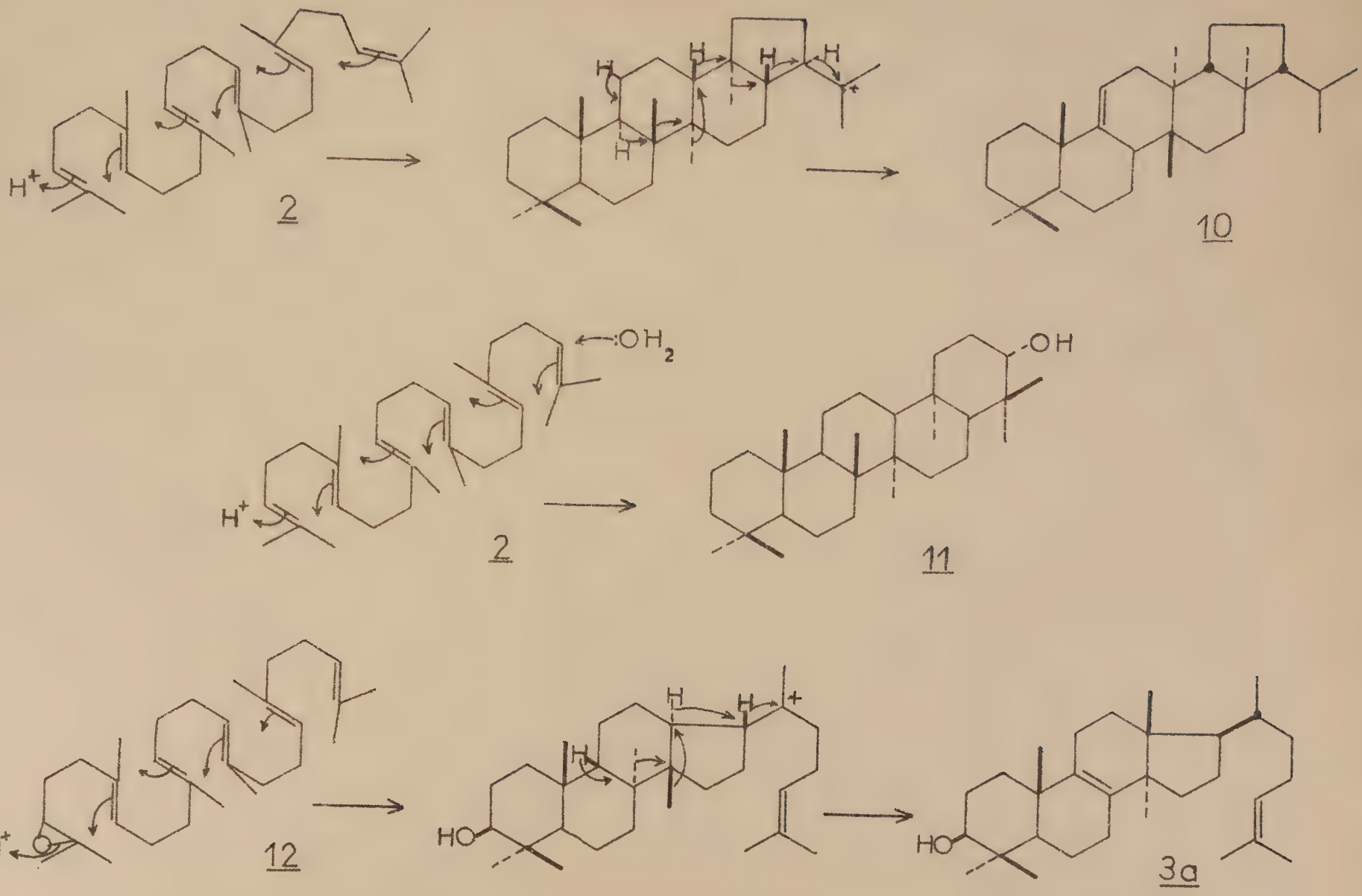


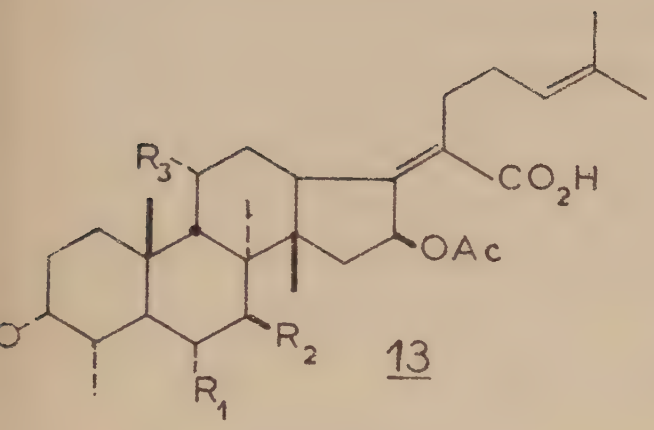
6



9

TABLEAU I



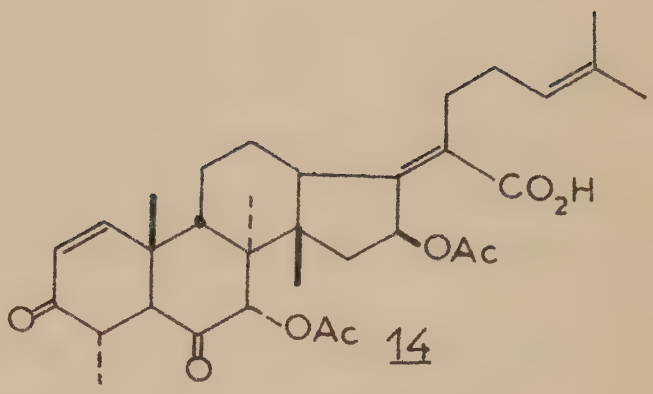


13

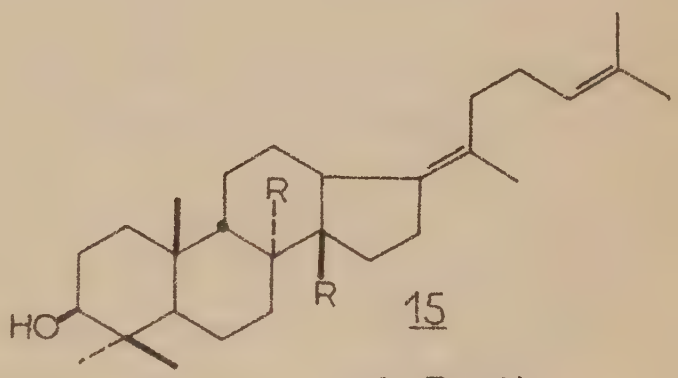
a $R_1 = R_2 = H$ $R_3 = OH$

b $R_1 = OAc$ $R_2 = OH$

$R_3 = H$



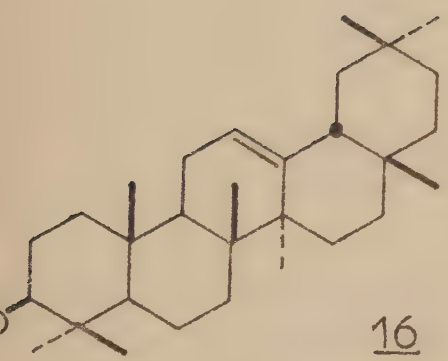
14



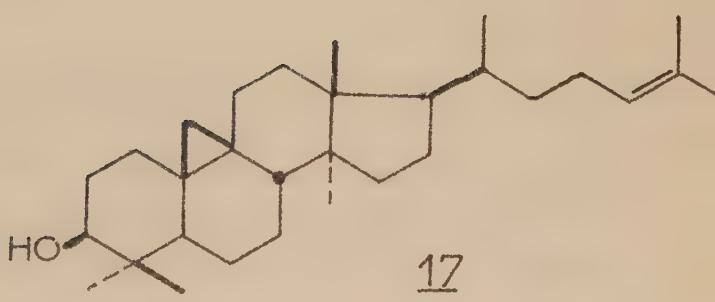
15

a R = H

b $R = CH_3$



16



17

- Divers analogues de l'époxyde de squalène peuvent être métabolisés in vitro (13,14); si les carbones 10 et 15 de l'époxyde (qui correspondent aux carbones 8 et 14 du lanostérol) portent des hydrogènes au lieu de méthyles, la cyclisation se fait, mais pas les transpositions et on obtient l'analogue 15a du protostérol 15b.
De même l'époxy-2,3 déhydro-20,21 squalène est transformé en déhydro-protostérol par la cyclase de l'époxy-2,3 squalène: la destabilisation du cation entre les carbones 20, 23 et 25 ne permet plus les réarrangements en lanostérol.

- Avec des systèmes enzymatiques autres que ceux des homogénats de foie de rat, on a obtenu de la β-amyrine 16 (I5), l'acide fusidique 13a (I6), du cycloarténol 17 (17) à partir de l'époxy-2,3 squalène.

- BARTON et coll. (18) ont montré que l'époxyde de squalène est incorporé cent fois mieux dans le lanostérol que le lanostadiène par S.cerevisiae.

- REID (I9) a bloqué la biosynthèse des stérols de Nicotiana tabacum et accumulé l'époxyde de squalène par l'utilisation de SKF-7997*, alors qu'EPPENBERGER et coll. ont montré que dans les tissus de N.tabacum cultivés in vitro, cet époxyde est transformé en cycloarténol sous anaérobiose (20).
Le rôle d'intermédiaire de l'époxyde de squalène est donc général, sauf dans les cas, mentionnés plus haut, des triterpènes non hydroxylés en 3 (fernène et tétrahymanol).

I.2 TRANSFORMATION DU LANOSTEROL EN ZYMOSTEROL

De très nombreux travaux ont été effectués pour déterminer les différents produits de cette séquence; nous nous bornerons à en indiquer les grandes lignes et les principaux produits mis en évidence.

Notons d'abord que la réduction de la double-liaison de la chaîne latérale semble être tout-à-fait indépendante des réactions subies par le reste de la molécule (21):dans les animaux, la série

*SKF-7997= trichlorhydrate du triphosphate de diéthylaminoéthyl-2.

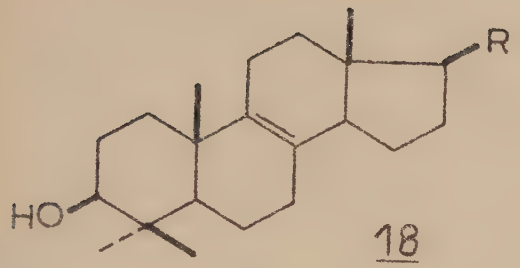
à chaîne latérale saturée et celle à chaîne insaturée sont connues toutes deux à partir du méthyl-4 α-cholestèn-8-ol-3β (22).

BLOCH et coll (23) ont montré que le méthyle en 14α du lanostérol est éliminé sous forme de CO_2 après oxydation en acide et que le diméthyl-4,4 cholestadièn-8,24 ol-3β 18 est un intermédiaire de la réaction.

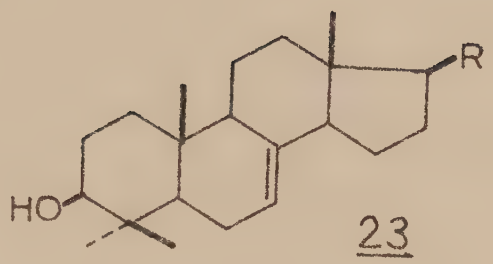
AKHTAR et coll. (25) ont démontré la nécessité d'une oxydation en 15 et la perte de l'hydrogène 15α pour permettre cette élimination: à partir du dihydrolanostérol, il se forme, in vitro, du diméthyl-4,4 cholestadièn-8,14 ol-3β 19a qui a été isolé et qui peut être métabolisé en cholestérol par des homogénats de foie de rat.

CANONICA et coll. (26) sont arrivés au même résultat, alors que SCHROEPFER et coll. (27a) ont pu montrer que le cholestadièn-8,14 ol-3β 19b est lui aussi transformé en cholestérol dans ces conditions: l'absence des méthyles en 4 n'a donc pas d'influence sur le déroulement de la réaction. Après avoir montré que, comme le diméthyl-4,4 cholestèn-8(I4)ol-3β 20a (24), le cholestèn-8(14)ol-3β 20b peut lui aussi être métabolisé en cholestérol in vitro (27b), ces auteurs ont réussi à l'isoler de la peau du rat (27c). Il se peut que suivant les tissus étudiés, le lanostérol subisse d'abord les déméthylations en 4, puis en 14α, ou inversement, ou que les vitesses relatives de ces réactions diffèrent.
Notons que deux analogues de 20 ont été décrits dans des plantes: le stigmastadièn-8(14),22 ol-3β 21 dans Haplopappus heterophyllus (28) et le 5β-stigmastèn-8(14) ol-3α (?) 22 dans Daemia extensa (29).

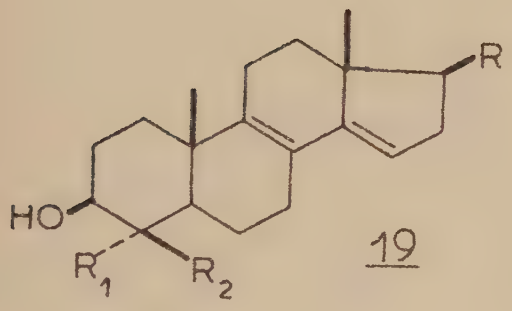
SWINDELL et GAYLOR (30) ont pu mettre en évidence, in vitro, la séquence suivante:
diméthyl-4,4 cholestèn-7 ol-3β 23 $\rightarrow$ méthyl-4α cholestèn-7 one-3 24a $\rightarrow$ méthyl-4α cholestèn-7 ol-3β 24b $\rightarrow$ cholestèn-7 one-3 24c $\rightarrow$ cholestèn-7 ol-3β 24d.
In vivo, il est probable que cette séquence se fait au moins partiellement avec les produits insaturés en 8(9) au lieu de 7(8), puisqu'en



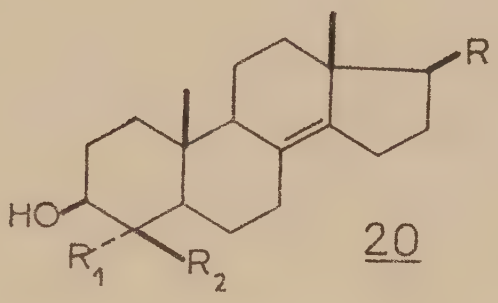
18



23



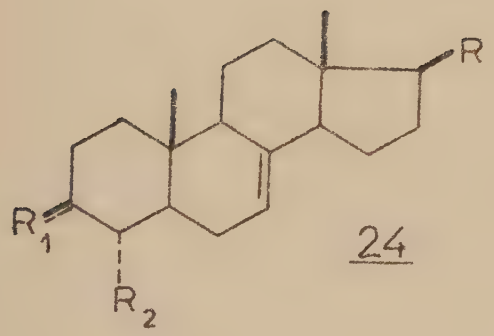
19



20

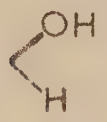
a $R_1 = R_2 = CH_3$

b $R_1 = R_2 = H$

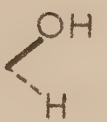


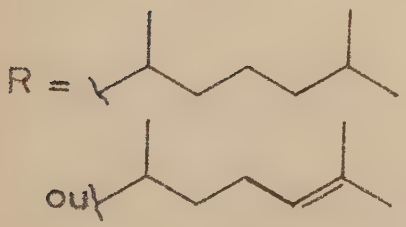
24

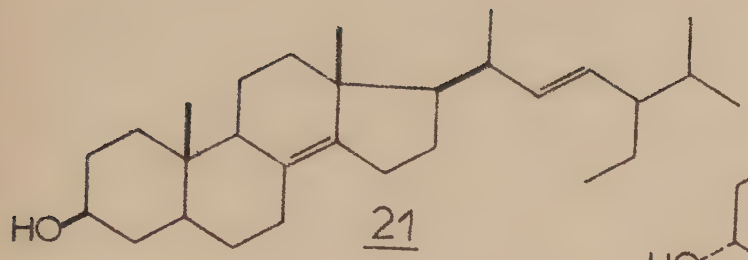
a $R_1 = =O$ $R_2 = CH_3$

b $R_1 =$  $R_2 = CH_3$

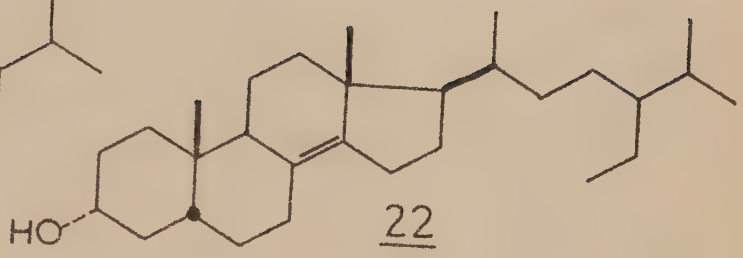
c $R_1 = =O$ $R_2 = H$

d $R_1 =$  $R_2 = H$

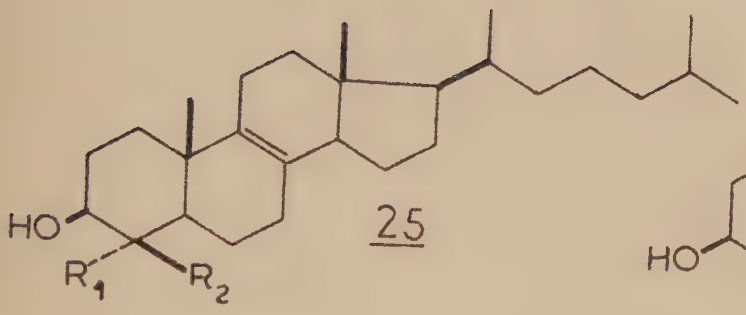
R = 



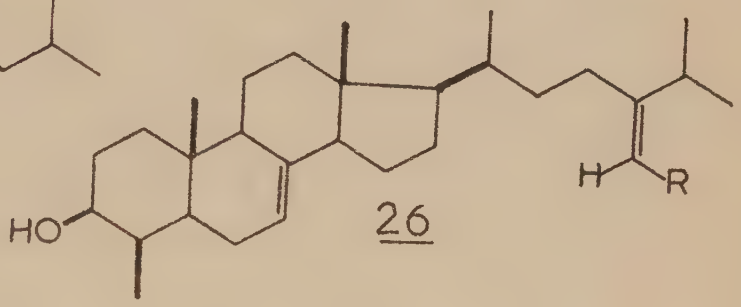
21



22



25



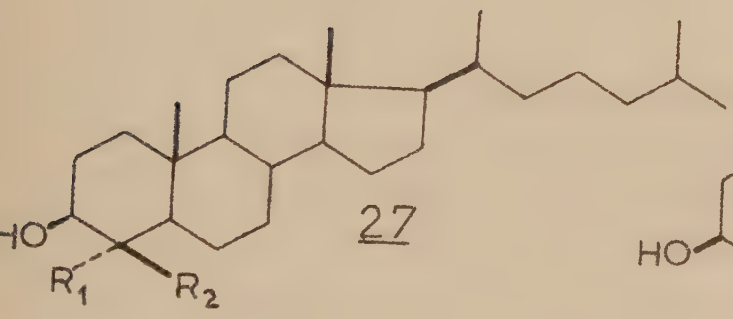
26

a $R_1 = CH_3$ $R_2 = H$

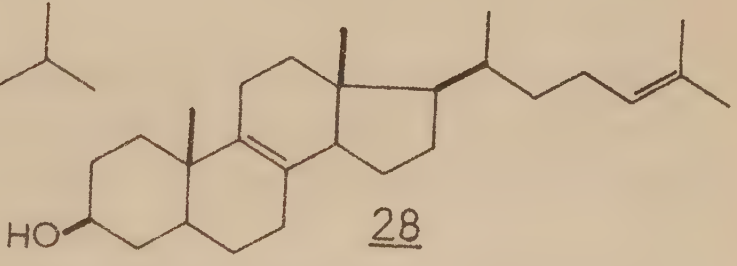
b $R_1 = H$ $R_2 = CH_3$

a $R = H$

b $R = CH_3$



27



28

a $R_1 = CH_2OH$ $R_2 = CH_3$

b $R_1 = CH_3$ $R_2 = CH_2OH$

fait on obtient le zymostérol.

Alors que KANDUTSCH (31) indiquait avoir isolé le méthyl-4α cholestèn-8 ol-3β 25a d'une tumeur, SANGHVI et coll. (32) attribuaient la formule du méthyl-4β cholestèn-8 ol-3β 25b à un produit isolé de la peau de rat traité au "Triparanol" * (33); dans les fleurs de Calendula officinalis, PYREK (34) vient de signaler l'existence de méthyl-4β ergostadièn-7,24(28) ol-3β 26a et de méthyl-4β stigmastadièn-7,24 (28) ol-3β 26b.

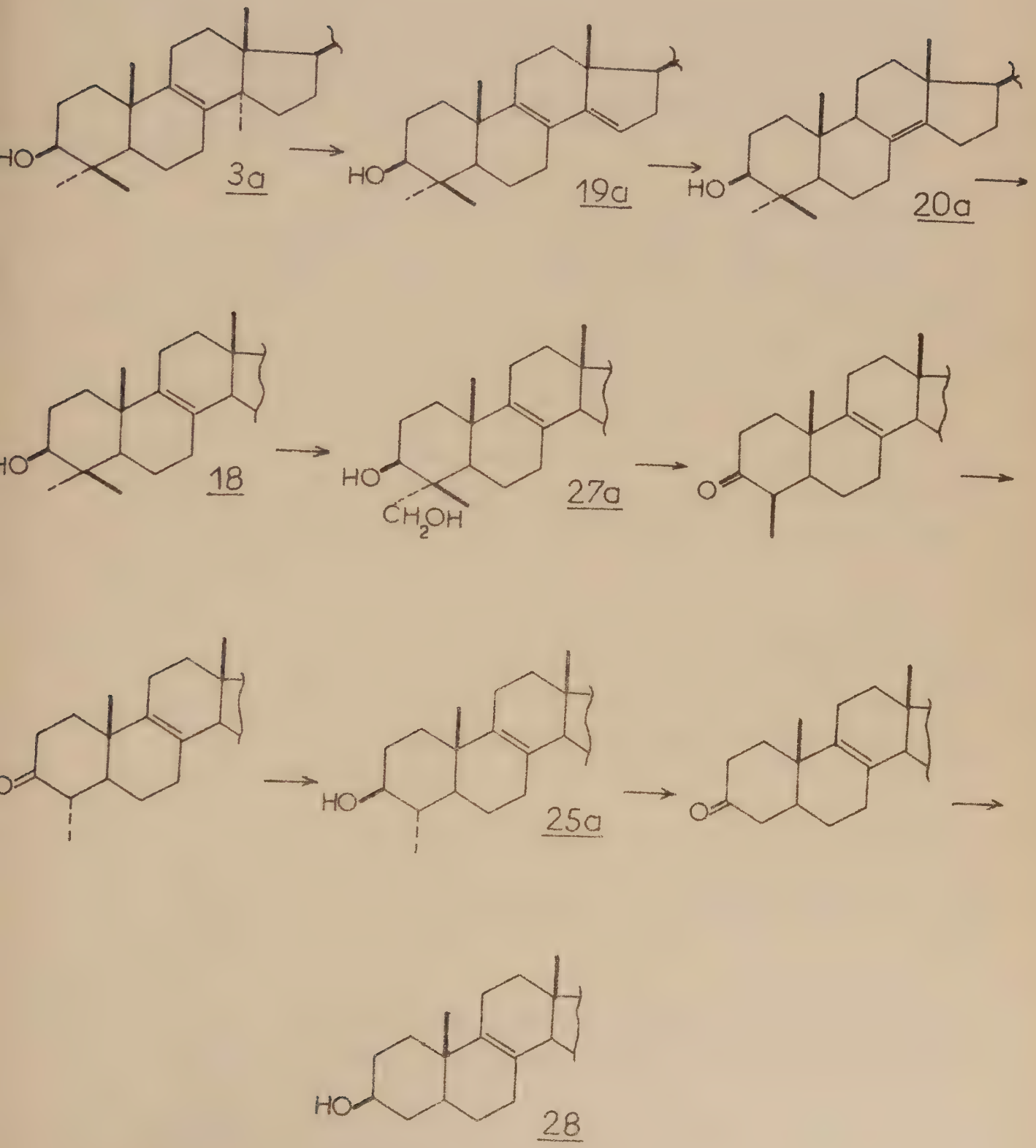
D'après ces résultats il semblerait que suivant les systèmes enzymatiques présents, ce serait le méthyle en 4β ou celui en 4α qui serait éliminé le premier. En fait, SHARPLESS et coll. ont montré qu'il n'en est rien: ils ont d'abord constaté (35a) que l'hydroxyméthyl-4α méthyl-4β cholestanol 27a est métabolisé en cholestérol par les enzymes du foie de rat et que son isomère en 4 27b ne l'est pas; ils ont conclu que c'est le groupe méthyle en 4α qui est attaqué le premier.
Comment alors expliquer l'existence des méthyl-4α stérols. Ces auteurs sont arrivés à la conclusion que seul le méthyle en 4α pouvait être attaqué et que, après la première déméthylation, le méthyle en 4β s'épimérise par l'intermédiaire de la cétone en 3 (35b). Par ceci, on revient à la séquence de GAYLOR qui avait montré le passage par une méthyl-4α cétone.

La deuxième déméthylation en 4 nous amène au zymostérol ou cholestadièn-8,24 ol-3β 28, isolé tout d'abord des levures (36-38) et dont SCHROEPFER (39) a montré qu'il était métabolisé en cholestérol par les enzymes du foie de rat.

Dans le tableau II, nous représentons le passage du lanostérol au zymostérol tel qu'il ressort des résultats ci-dessus.

*Triparanol = 1-(p-tolyl)-1- p-(β-diéthylaminoéthoxy)phényl -2-(m-chlorophényl)éthanol.

TABLEAU II



I. 3 TRANSFORMATION DU ZYMOSTEROL EN CHOLESTEROL.

La première étape de cette séquence est la migration de la double-liaison de la position 8(9) à la position 7(8); pour que cette migration puisse avoir lieu, il faut que le méthyle en 14α ait été éliminé; d'autre part, la présence de méthyles en 4 ralentit la réaction (40).

Un certain nombre de travaux ont été faits concernant cette isomérisation: il a été montré que l'hydrogène se fixant en 9 vient du milieu et non de la position 7 par un simple déplacement intramoléculaire (41,42a); de plus, dans le foie de rat, c'est l'hydrogène 7β qui est éliminé (42b, 43, 44a), alors que dans le cas d'un homogénat de levure, c'est l'hydrogène 7α (44b).

Les premiers produits attendus de cette séquence sont donc le cholestèn-7 ol-3β 29a détecté par IDLER dans la peau de rat (45) et le cholestadièn-7,24 ol-3β 29b isolé de la peau de rat traité au "Triparanol" (46).

Le cholestèn-7 ol-3β 29a est métabolisé en cholestérol par un homogénat de foie de rat, de même que le cholestadièn-5,7 ol-3β 30a; par contre, le cholestèn-6 ol-3β 31a n'est pas transformé dans ces conditions. L'oxygène est nécessaire dans la transformation de 29a, mais pas dans celle de 30a (47).

Ensuite, DEMPSEY et coll. ont montré (48) qu'on a la séquence suivante:
cholestèn-7 ol-3β 29a $\xrightarrow{O_2}$ cholestadièn-5,7 ol-3β 30a $\xrightarrow{NADPH}$ cholestèn-5 ol-3β 32a.

Un certain nombre d'auteurs ont étudié ces réactions par l'utilisation d'AY-9944* qui bloque la réduction de la double-liaison

* AY-9944 = dichlorhydrate du trans-1,4 bis-(2-chlorobenzylaminométhyl) cyclohexane.

en 7 de 30a (49-52a). En traitant un porc simultanément par le "Triparanol" et le produit AY-9944, DVORNIK et coll. (52b) ont détecté du cholesta-trièn-5,7,24 ol-3β 30b dont SCALLEN a montré qu'il est métabolisé en cholestérol par le rat in vitro et in vivo (53).

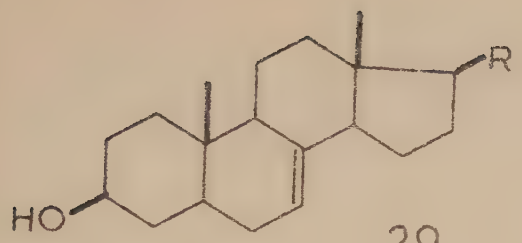
La stéréochimie de la formation de la double-liaison en 5 a été étudiée et il a été montré que ce sont les hydrogènes 5α et 6α qui sont éliminés (54,55).

La réduction de la double-liaison en 7 se fait par introduction d'un hydrogène, provenant de NADPH, en 7α et d'un hydrogène, provenant du milieu, en 8β dans le cas d'homogénats de foie de rat (56).

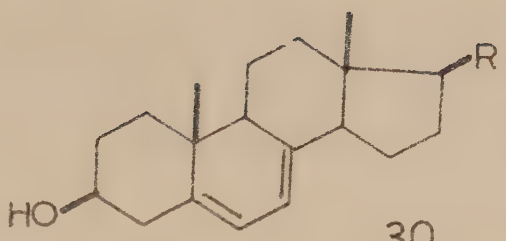
Le desmostérol 32b ainsi formé a d'abord été isolé d'embryons de poussins (57a), puis de la peau et du foie de rat (57b,58), du cerveau et de la myéline de rats très jeunes (59,60).

Sous l'action du "Triparanol" ou du diaza-22,25 cholestanol, la concentration du cholestérol dans le sérum diminue fortement et du desmostérol s'accumule en quantités importantes (61-63).
Ce produit a encore été détecté en grandes quantités (30 à 80% des stérols) dans des crustacés (64a,b), des algues (64c), des plantes (graines de Funtumia elastica (65)); par chromatographie en phase gazeuse et incorporation d'acétate dans les feuilles de F. elastica, nous avons constaté que le desmostérol est là aussi de loin le plus abondant des stérols.

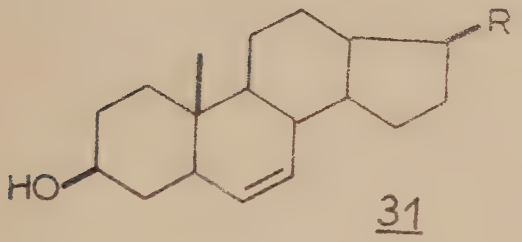
Signalons enfin que ALCAIDE et coll (66a) ont réussi à le faire métaboliser en cholestérol et en méthyl-24 cholestèn-5 ol-3β (campestérol) par Nicotiana tabacum. Il n'y a eu qu'une seule méthylation, contrairement à ce que ces mêmes auteurs ont constaté en incorporant du méthylène-24 lanostérol qui est transformé en phytostérols C-29 (66b). Il semble que chez les végétaux supérieurs, les méthylations se fassent de préférence au stade des triterpènes et des méthyl-4α stérols.



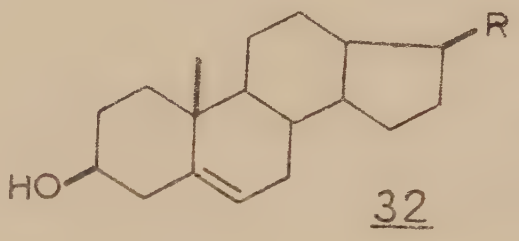
29



30



31

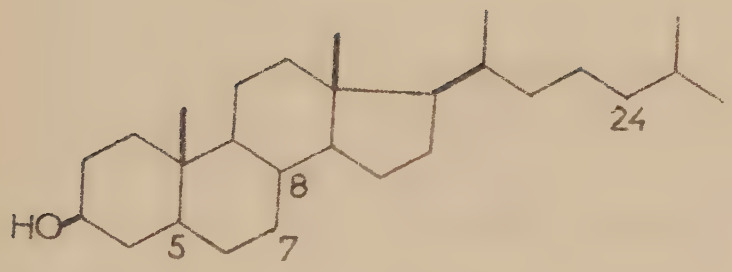


32

a R=

b R=

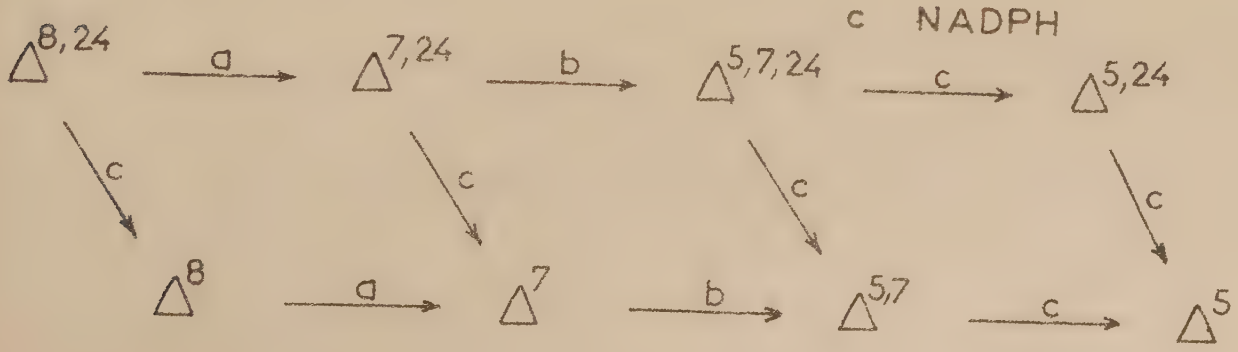
TABLEAU III



a Δ^8-Δ^7 isomérase

b O_2

c NADPH



Le tableau III tiré de (21) résume les différentes voies de biosynthèse possibles entre le zymostérol et le cholestérol.

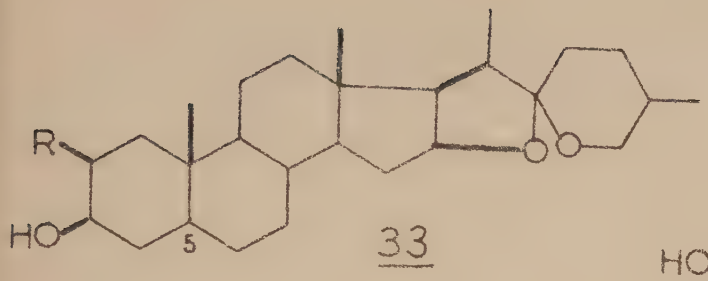
II. LES STEROLS ET TRITERPENES VEGETAUX.

II. 1 LES STEROLS.

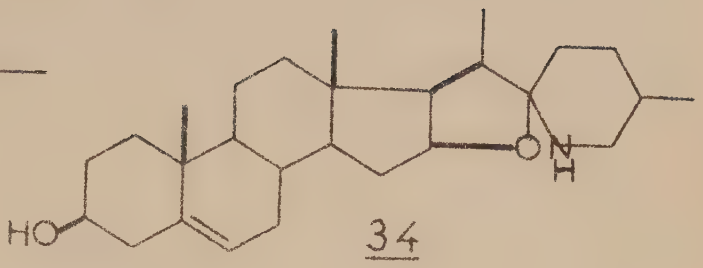
Contrairement aux tissus animaux où il est toujours le stérol majeur, le cholestérol n'a été mis en évidence que dans un nombre restreint de plantes (64c, 67-71); ce n'est généralement qu'un stérol mineur, parfois à peine décelable.

Cependant l'existence de sapogénines stéroliques (par ex: diosgénine 33a, gitogénine 33b), de certains alcaloides de Solanum tuberosum (par ex: solasodine 34), des produits de la famille de l'ecdysone 35 qui ont pour la plupart la chaîne latérale du cholestérol, peut faire admettre que le cholestérol est généralement présent dans le règne végétal mais en quantités habituellement très faibles. De plus, le cholestérol est métabolisé par plusieurs plantes en des produits normalement présents dans ces plantes: en tigogénine 33c et gitogénine 33b par Digitalis lanata (72); en diosgénine 33a et kryptogénine 36 par Dioscorea spiculiflora (73a); en prégnénolone 37 par Haplopappus heterophyllus (73b) et Digitalis purpurea (74); en ponastérone A 38 par Podocarpus macrophyllus.

Mais les phytostérols les plus répandus possèdent en 24 une ramification de un ou deux atomes de carbone; ces méthylations sont dues à l'action de la méthionine (76-81). Nous ne parlerons pas ici des travaux effectués pour élucider l'introduction de ces ramifications.



33

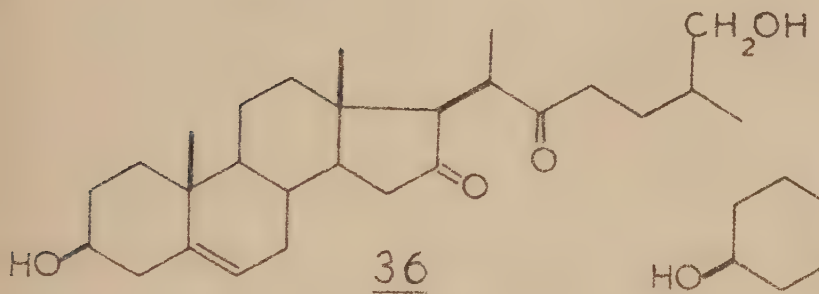


34

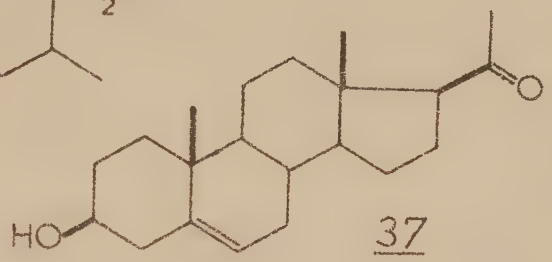
a R=H Δ5

b R=OH 5αH

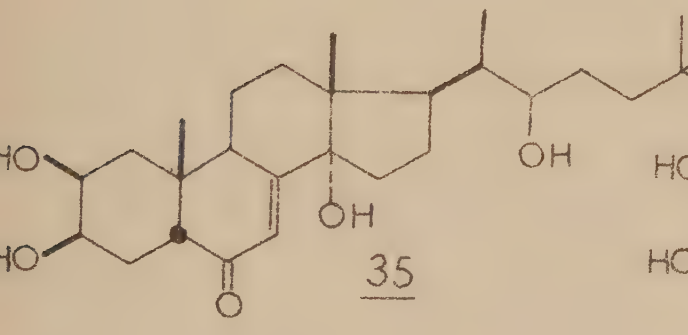
c R=H 5αH



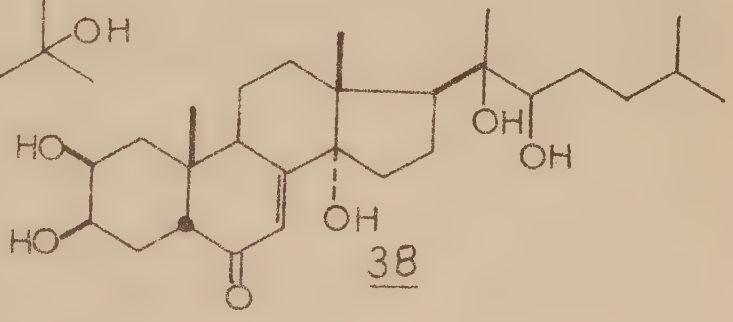
36



37



35



38

Dans le tableau IV, nous citerons les plus importants de ces stérols, avec chaque fois quelques références concernant leur mise en évidence (il serait impossible de les donner toutes pour certains produits du moins).

TABLEAU IV

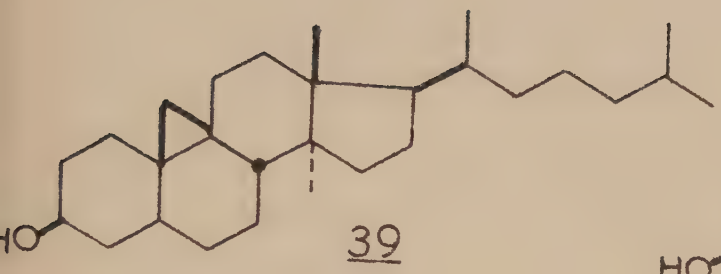
	Δ^5	Δ^7	$\Delta^{5,7}$	$\Delta^{5,22}$	$\Delta^{7,22}$	$\Delta^{5,7,2}$
méthyl-24 ξ cholestérol	(68,84)	(82)	(84)	(83)		(83)
méthylène-24 "	(68)	(82)				
éthyl-24 ξ "	(68,83-85)	(82,85)	(85)	(68,83-85)	(82,85)	(83,85
éthylidène-24 "	(68)	(82)				

Quelques autres stérols sont connus tels le stigmastadièn-8 (14),22 ol-3β 21 (28), le stigmastadièn-5,28(29) diol-3β,24 isolé d'algues brunes (86), quelques produits à double-liaison en 25 (87).

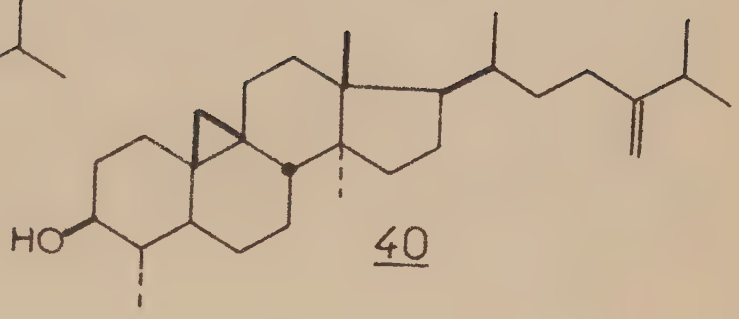
Un stérol mérite une mention particulière: c'est le pollinastanol 39 qui possède un noyau cyclopropanique et un méthyle en 14α (82).

II. 2 LES METHYL-4 STEROLS.

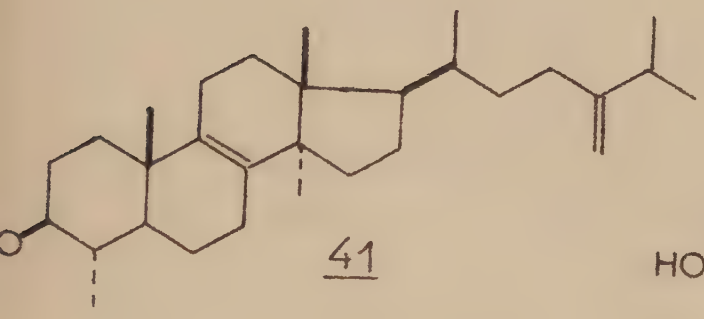
Dans les animaux, il semble que le méthyle en 14α soit éliminé avant les méthyles en 4 dans le passage triterpènes-stérols. Dans les plantes, par contre, on n'a isolé jusqu'ici aucun produit possédant les deux méthyles en 4 et ayant perdu le méthyle en 14α. Par contre, l'existence de diméthyl-4α, 14α stérols tels le cycloeucalénol 40 et



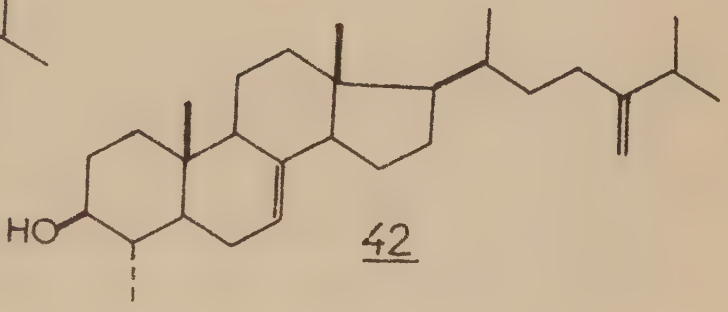
39



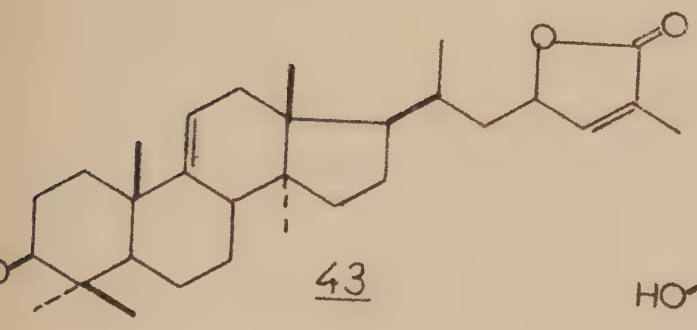
40



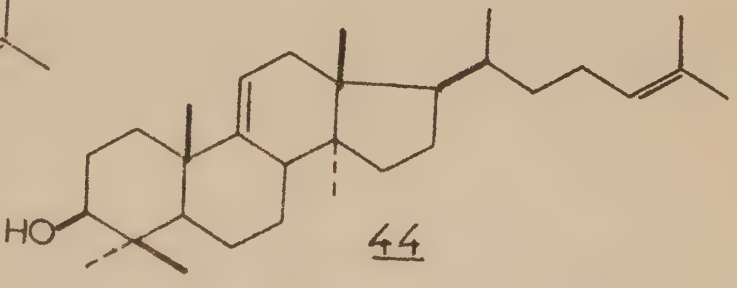
41



42



43



44

l'obtusifoliol 41 (qui dérive probablement de 40 par ouverture du cyclopropane) indique la possibilité de la perte initiale d'un méthyle en 4. Grâce à son insaturation en 8(9), l'obtusifoliol peut perdre son méthyle 14α et donner le méthylène-24 lophénol 42. Il n'est pas interdit de penser que dans certains cas, le cycloeucalénol puisse se déméthyler en 4 pour donner un produit de la série du pollinastanol.

Dans les graines de Funtumia elastica, nous avons mis en évidence le nor-31 lanostérol 3c, l'homologue inférieur de l'obtusifoliol (65).

II. 3 LES TRITERPENES.

Le lanostérol n'a été que très rarement identifié dans les tissus végétaux: le seul cas indubitable est celui de certains latex d'Euphorbes où il coexiste toujours avec le cycloarténol 17 et le méthylène-24 cycloartanol (88). Ses dérivés immédiats ne sont accumulés qu'exceptionnellement: abieslactone 43 dans Abies mariesii (89), parkeol 44 dans Butyrospermum parkii (90).

A la suite de nos premiers résultats, nous avons effectué une étude bibliographique sur la présence du cycloarténol et de ses analogues dans les plantes (tableauIV).

Dans ce tableau:

-pour la colonne 1, le signe + indique la présence de cycloarténol et le signe X celle de méthylène-24 cycloartanol.

-pour la colonne 2, le signe + indique la présence d'autres triterpènes cycloarténiques.

-dans la colonne 3, nous avons relevé les produits déméthylés en 4: cycloeucalénol (Ce), nor-31 cycloartanol (Ca), pollinastanol (P) et nor-31 cyclolaudénol (Cl).

-dans le cas des Buxacées, les dérivés cycloarténiques sont divers alcaloïdes fréquemment juxtaposés avec des alcaloïdes à cycle B-homo.

TABLEAU V

I. CRYPTOGAMES					
ALGUES					
Phaeophycées	Fucus spiralis	+			1
Rhodophycées	Rhodomela conferoides	+			2
	Chondrus crispus	+			2
	Rhodymenia palmata	+			2
?	Ochromonas danica	+ x			3
	Ochromonas malhamensis	+ x			3
Chlorophycées	Enteromorpha intestinalis	+ x			4
	Ulva lactuca	+ x			4
FOUGERES					
	Polypodium vulgare		+	Cl	5,6
	Ceterach officinarum Lam.		+		5
	Phylittis scolopendrium Newm.		+		5
	Blechnum filiforme		+		60
II. PHANEROGAMES					
GYMNOSPERMES					
Pinacées	Larix europea D.C.	+			1
	Larix decidua	+ x			7
ANGIOSPERMES					
a. Monocotylédones					
Alismatacées	Alisma plantago	+			55
Agavacées	Agave toumeyana Trel. (tissus cultivés in vitro)	+			8
Broméliacées	Tillandisia usneoides L.	+	+		9
Dioscoréacées	Dioscoréa composita L. (tissus cultivés in vitro)	+ x			8

Graminées	Oryza sativa L. (huile de son de riz)	+	x	+	10,11
	Zea mays L.				
	(huile de graines)	+	x	Ce	11,12
	(huile de germes)	+	x	+	13
Liliacées	Smilax aspera L.			Ca	14
Musacées	Musa sapientum	+	x	Ce	15
Palmées	Elaeis guineensis				
	(huile de palme)	+	x		11
	(huile d'amandes de palme)	+	x		11
	Cocos nucifera L.	+	x		11
b.Dicotylédones					
Anacardiacées	Mengifera indica			+	16
	Pistacia lentiscus	+			17
	Pistacia terebinthus	+			17
Apocynacées	Funtumia elastica (huile de graines)	+	x		18
	Tabernaemontana pacifica			+	19
Bétulacées	Betula verucosa	+	x		20
Buxacées	Buxus sp.			+	56-59
Compositées	Cichorium endivia L. (tissus cultivés in vitro)	+	x		8
	Hélianthus annuus (huile de graines de tourn.)	+	x		11
	Hypochoeris radicata			P	21
	Taraxacum dens-leonis			P	21
Cruciférées	Brassica rapa L. (huile de graines de colza)	+	x		11,22 23
	Camelina sativa	+			24
Euphorbiacées	Euphorbia (100 espèces !)	+	x	+ Ce	25
	Hevea brasiliensis L.	+			25
	Hura crepitans	+	x		26
	Ricinus communis L.	+	x		11
	Spondianthus preusii Engl.	+			25

Guttiférées	Garcinia kola	+ x			27
Lauracées	Persea americana	+ x			28
Léguminosées	Arachys hypogaea L.	+ x			11,29
	Medicago sativa L. (luzerne)	+			1
	Pisum sativum	+ x		Ce	1, 12
	Soja hispida Moench.	+			11
Linacées	Linum usitatissimum (huile de graines de lin)	+ x			11,30
Loganiacées	Strychnos nux-vomica (huile de graines)	+			31
Méliacées	Swietenia mahagoni Jacq.			Ce	32
Moracées	Artocarpus integrifolia		+		33
	Ficus macrophylla Roxh.	+	+		34
Myristicacées	Cephalosphaera usambarensis Warb.	x		Ce	35
Myrtacées	Tristania conferta	x		Ce	36,37
Oleacées	Olea europea (huile d'olives)	+ x			11
Papavéracées	Papaver somniferum L. (huile de graines de pavot)	+ x			11
	(opium)	+	+		38,39
	Papaver rhoeas		+		40
Pédaliacées	Sesamum indicum L (huile de sesame)	+ x			11
Ranunculacées	Cimicifuga racemosa Bart.		+		41
Rosacées	Cinepia grandifolia (oiticica)	+ x			11
	(tissus cultivés <u>in vitro</u>)	+ x			8
	Pyrus malus	+			42
Rutacées	Citrus decumana	+ x		Ce	43-45
Salicacées	Populus tremula	+ x			46,47
Sapotacées	Manilkara bidentata		+		48
Solanacées	Solanum tuberosum	+ x			49,50
	Nicotiana tabacum (feuilles)	+			8,51
	(tissus cultivés <u>in vitro</u>)	+ x		Ce	52,53

Sterculiacées	Theobroma cacao (huile de beurre de cacao)	+	x		11,54
Theacées	? (huile de graines de thé)	+	x		11
Umbellifférées	Daucus carota (tissus cultivés in vitro)	+	x		8
Vitacées	Vitis vinifera (huile de graines de vigne)	+	x		11

Voir références en appendice

Ce tableau nous permet de constater que:

-le cycloarténol est très largement répandu dans le règne végétal puisqu'on le trouve dans des phanérogames et des cryptogames. Ce triterpène, ou ses dérivés immédiats, a été mis en évidence dans toutes les espèces où il a été recherché !

-le cycloarténol n'a encore jamais été trouvé dans des champignons: les acides polyporéniques ont probablement le lanostérol comme précurseur.

III . LES TISSUS VEGETAUX CULTIVES IN VITRO.

La majeure partie de notre travail a été effectuée avec des tissus végétaux cultivés in vitro. Nous allons donc brièvement rappeler les travaux faits sur ce matériel.

Ce sont GAUTHERET (91)et WHITE (92) qui, vers la fin des années trente, ont les premiers réussi à cultiver des tissus végétaux in vitro. Ces tissus sont totalement indifférenciés (pas de feuilles, de racines, de tiges (93)) cependant dans certaines conditions de culture, il est possible d'obtenir des bourgeons capables de redonner des plantes, souvent morphologiquement différentes des plantes-mères (nombreuses petites feuilles, tiges fines, entre-noeuds très courts, bourgeons se développant à la base des tiges) (94).

Sur le plan biochimique, des travaux ont été effectués sur le métabolisme des acides nucléiques, des acides aminés, etc... et sur les propriétés de certains tissus d'héberger des virus.

On a trouvé des quantités généralement faibles d'alcaloïdes dans des tissus dérivant de plantes à alcaloïdes: nicotine (95, 96),

formonétine (98), solasonine (99). Dans divers tissus, STARA et coll. ont mis en évidence de la visnagine, des cardénolides, des alcaloïdes, de la diosgénine (100 a-e). D'autres auteurs ont trouvé du phytol, des sesquiterpènes (101,102).

Une voie nouvelle est indiquée par les travaux d'OVERTON et coll. (103), qui ont montré que des tissus d'Andrographis paniculata produisent trois lactones sesquiterpéniques nouvelles, alors que l'andrographolide, un des constituants majeurs de la plante, n'a pas pu être détecté.

La composition du milieu sur lequel poussent les tissus est primordiale. En effet, nous avons en vain recherché de la diosgénine dans des tissus de Dioscorea composita cultivés sur milieu Knop, alors que GRABOW en a détecté dans des tissus analogues poussant sur milieu Murashige-Skoog (104).

A notre connaissance les seuls travaux effectués sur la biosynthèse des stérols dans des tissus végétaux cultivés in vitro ont été ceux de notre laboratoire (105): dans les tissus de Nicotiana tabacum, ont été mis en évidence le squalène et son époxyde, le cycloarténol et le méthylène-24 cycloartanol, le cycloeucalénol, l'obtusifoliol, le méthylène-24 et l'éthylidène-24 lophénol, le campestérol, le stigmastérol et le β-sitostérol.

CHAPITRE I.

RECHERCHE DU CYCLOARTENOL

ET DU LANOSTEROL

DANS DIVERSES ESPECES VEGETALES

-°-°-°-°-

Ce chapitre a été publié dans Phytochemistry 6, 815 (1967).
Nous reproduisons le texte de cet article in extenso.

ETUDES SUR LES TRITERPENES PRECURSEURS DES PHYTOSTEROLS. RECHERCHE DU CYCLOARTENOL ET DU LANOSTEROL DANS DIVERSES ESPECES VEGETALES*

J.D. EHRHARDT, L. HIRTH et G. OURISSON
Département des Applications Biologiques du Centre de Recherches Nucléaires, Strasbourg-Cronenbourg, France

Résumé : Le cycloarténol est décelé par son marquage après incorporation d'acétate 1-^{14}C, dans les feuilles de Tabac, et dans les tissus cultivés in vitro d'Agave toumeyana, de Dioscorea composita, de ronce, d'endive et de carotte. Le lanostérol, la lanostadiénone, le lanostadiène ne peuvent être décelés dans ces conditions.

Summary : Cycloartenol is labelled after incubating the following plant materials with 1-^{14}C-acetate : tobacco leaf-disks, and tissue cultures of Agave toumeyana, Dioscorea composita, bramble, endive and carot. Lanosterol, lanostadienone and lanostadiene are not detectably labelled in these experiments.

---

* Travaux entrepris dans le cadre de la Recherche Coopérative sur programme N° 34 du C.N.R.S., intitulée : "L'utilisation des tissus végétaux cultivés in vitro pour l'étude des produits naturels".

INTRODUCTION

Le problème de la biosynthèse des phytostérols comporte deux aspects différents: le premier concerne l'origine du squelette et de la chaîne latérale iso-octanique; le second est relatif à l'origine de la ramification habituellement présente en C-24.

Pour ce qui est de ce dernier aspect, grâce, entre autres, aux travaux des groupes de NES (1), de LEDERER (2), d'ARIGONI (3), de GOODWIN (4), on sait que le groupe alcoyle en C-24 provient du méthyle de la méthionine et le mécanisme intime de l'incorporation de ce fragment commence à être connu.

En ce qui concerne l'origine du système tétracyclique et de la chaîne latérale (non substituée en C-24), on a admis implicitement pour les végétaux supérieurs la validité de la séquence démontrée dans les tissus animaux ou dans les levures: formation de squalène, cyclisation en lanostérol, suivie de déméthylation en 4 et 14 (précédant ou suivant l'alcoylation en C-24). Cette séquence n'a cependant pas été démontrée intégralement chez les végétaux supérieurs.

---

(1) M. CASTLE, G. BLONDIN et W.R. NES, J. amer.chem.Soc. 85, 3306(1963)

(2) a - E. LEDERER, Biochem. J., 93, p. 449 et références citées.
b - V.R. VILLANUEVA, Thèse, Paris, 1964.

(3) S. BADER, L. GUGLIELMETTI et D. ARIGONI, Proc. Chem. Soc. 16(1964)

(4) L.J. GOAD, A.S.A. HAMMAM, A. DENNIS et T.W. GOODWIN, Nature, 210, 1322, (1966).

En utilisant du squalène radioactif comme précurseur, BENNETT et HEFTMANN ont réussi à marquer le β-sitostérol des cotylédons de plantules de Pharbitis nil Chois. (5); avec de l'acide mévalonique 2-^{14}C, ils marquent les stérols (β-sitostérol, stigmastérol, cholestérol) et les sapogénines stéroliques (diosgénine, yamogénine, corrélogénine, gentrogénine) de Dioscorea spiculiflora Hemsl. (6) et, avec du cholestérol 4-^{14}C, ils marquent les sapogénines de cette plante (7). Mais les intermédiaires entre squalène et stérols ne sont pas identifiés par ces expériences; en particulier les triterpènes tétracycliques n'ont pas été étudiés.

Dans le cas des tissus de tabac cultivés in vitro, BENVENISTE et coll. ont montré (8) que l'incorporation d'acétate radioactif est très rapide dans une fraction hydrocarbonée, identifiée au squalène; successivement se marquent les triterpènes, les méthyl-4α stérols et les phytostérols. La fraction triterpénique, dans laquelle était attendu le lanostérol (Ia), renferme son isomère, le cycloarténol (IIa), et le méthylène-24 cycloartanol (IIIa). La recherche du lanostérol dans ce matériel a été vaine, même avec des marquages intenses et de durée optimale. Bien sûr, l'absence de lanostérol en quantité décelable n'exclut pas qu'il puisse être un intermédiaire à renouvellement trop rapide pour être décelé. En outre, même si l'on admet l'absence totale de lanostérol, on peut supposer que son rôle est joué, soit par la lanostadiénone (Id), soit par le lanostadiène (Ic). La cétone en 3 est cependant connue, dans les tissus animaux, comme n'étant pas un intermédiaire entre lanostérol et cholestérol (9).

---

(5) R.D. BENNETT et E. HEFTMANN, Phytochem., 4,475 (1965)

(6) R.D. BENNETT, E. HEFTMANN, W.H. PRESTON et J.R. HAUN, Arch.Bioch. Bioph., 103, 74 (1963)

(7) R.D. BENNETT et E. HEFTMANN, Phytochem., 4, 577 (1965)

(8) P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON, Phytochem. 5,45 (1966)

(9) K. BLOCH, CIBA Foundation Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols 6 (1959).

En ce qui concerne l'hydrocarbure, BARTON et MOSS (10) ont réussi, en le prenant comme précurseur, à marquer le lanostérol de Saccharomyces cerevisiae de façon faible, mais décelable; ils suggèrent que la cyclisation du squalène pourrait se faire aussi sous l'action de "H^+" et pas seulement de "OH^+" comme il est communément admis, et que l'hydroxylation en 3 pourrait suivre la cyclisation*. Cependant, ils n'ont pas réussi à détecter de lanostadiène marqué après incorporation d'acide mévalonique 2-^{14}C.

Le travail que nous présentons ici tend à répondre aux questions suivantes:

-l'absence de lanostérol en quantité décelable est-elle une particularité des tissus de tabac cultivés in vitro, ou bien vaut-elle pour la plante d'origine?

-vaut-elle pour les tissus d'autres plantes, cultivés in vitro?

-est-elle simplement due à la participation de lanostadiénone ou de lanostadiène à la biosynthèse des phytostérols, à la place du lanostérol?

Comme nous le verrons, nos résultats ne font que confirmer, sur divers matériaux, l'absence de quantités décelables de lanostérol et de ses équivalents oxydé ou réduit. Nous montrons d'une part que dans les

---

(10) D.H.R. BARTON et G.P. MOSS, Chem. Comm., 261 (1966)

* Il a cependant été démontré par les groupes de Corey et de Van Tamelen que l'époxyde de squalène était un intermédiaire normal dans le passage du squalène au lanostérol. Ceci n'exclut évidemment pas que d'autres voies soient utilisées concurremment.

E.J. COREY, W.E. RUSSEY, P.R. ORTIZ de MONTELLANO, J. amer. chem. Soc. 88, 4750 (1966)

E.J. COREY et W.E. RUSSEY, ibid. 88, 4751 (1966)

E.E. VAN TAMELEN, J.D. WILLETT, R.B. CLAYTON et K.E. LORD, ibid. 88, 4752 (1966)

feuilles de tabac, dans les tissus de Dioscorea composita, d'Agave toumeyana de ronce, d'endive et de carotte cultivés in vitro, l'acétate est un précurseur du cycloarténol et du méthylène-24 cycloartanol, et d'autre part que la lanostadiénone et le lanostadiène ne sont pas marqués de façon décelable dans les tissus de tabac cultivés in vitro.

METHODES

TABAC

On utilise des plants de Nicotiana tabacum, variété "Judy Pride", agés de trois mois, cultivés en serre stérile.

Ces plants sont placés 12 h à l'obscurité totale, puis exposés 6 h à une lumière de 3000 lux; on prélève les feuilles et les découpe à l'emporte-pièces en disques d'environ 2 cm de diamètre. Ces disques sont alors posés à la surface d'une solution nutritive de Knop diluée de son volume d'eau, additionnée d'acétate 1-^{14}C. On laisse incorporer pendant 6 h.

TISSUS CULTIVES IN VITRO

Les tissus de tabac utilisés pour la recherche du lanostadiène et de la lanostadiénone sont cultivés selon HIRTH (11); ceux de Dioscorea composita, de ronce et de carotte, fournis par le Professeur GAUTHERET, sont cultivés sur milieu Heller (12), ceux d'Agave toumeyana Trel., provenant du Dr. TULECKE, sur milieu White (12) et l'endive, dont la souche a été établie par M. Lutz, sur milieu Skoog.

---

(11) L. HIRTH, Thèse Paris 1958

(12) R.J. GAUTHERET, La culture des tissus végétaux, Masson et Cie Paris, 12 (1959)

Tous ces milieux sont additionnés de 1,2% de gélose pour les solidifier. Pour effectuer les incorporations, les tissus sont transférés sur milieu sans gélose, additionné d'acétate radioactif. Pendant toute la durée de l'incorporation, les cultures sont aérées par rotation mécanique dans des erlenmeyers placés sur un plateau (50 t/mn).

ISOLEMENT DES PRODUITS

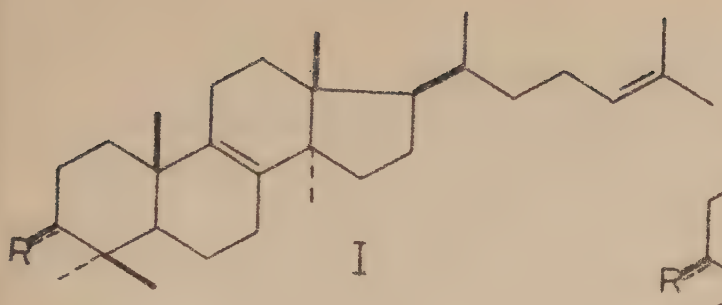
Après incorporation, les feuilles ou les tissus sont prélevés, lavés, lyophilisés, extraits à l'éther de pétrole. Une chromatographie de l'extrait sur colonne de silice (feuilles de tabac) ou sur plaques préparatives permet de séparer, après addition d'entraîneurs, les fractions correspondant à la lanostadiénone, aux triterpènes, aux phytostérols.

Les triterpènes, rechromatographiés pour les débarrasser des méthyl-4α-stérols, sont acétylés à froid par le mélange anhydride acétique-pyridine (1-1) et chromatographiés sur plaques de silice imprégnées de 10% de nitrate d'argent. Dans le cas de Dioscorea composita, cette technique permet de séparer les acétates de β-amyrine (IVb) et de méthylène-24 cycloartanol (IIIb), et le mélange des acétates de cycloartényle et de lanostéryle (inséparables dans ces conditions) (Ib et IIb).

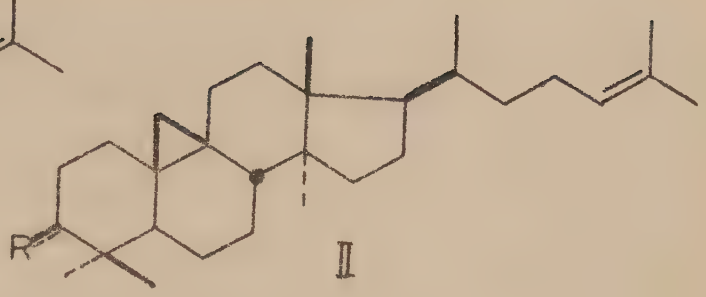
Pour résoudre ce mélange, on en effectue l'époxydation par l'acide p-nitroperbenzoïque dans l'éther (13); on sépare les acétates-époxydes obtenus, par chromatographie préparative sur couche de silice. Les acétates-époxydes obtenus (V,VI,VII) sont,soit rechromatographiés (feuilles de tabac), soit recristallisés dans le méthanol, et leur activité spécifique est mesurée.

---

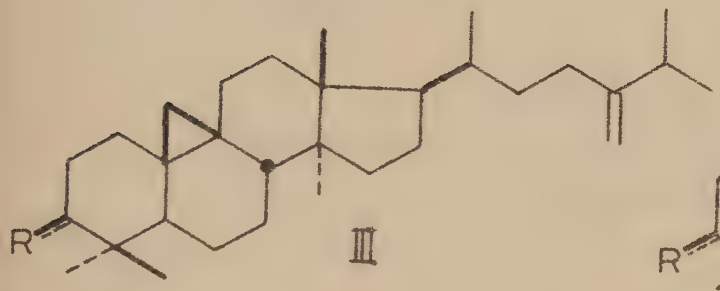
(13) G. PONSINET et G. OURISSON, Phytochem., 4, 799 (1965)



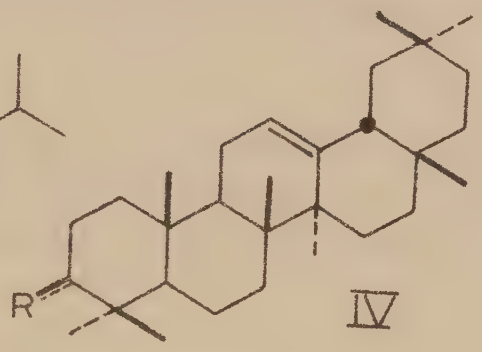
I



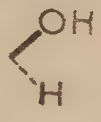
II

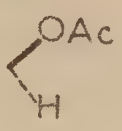


III



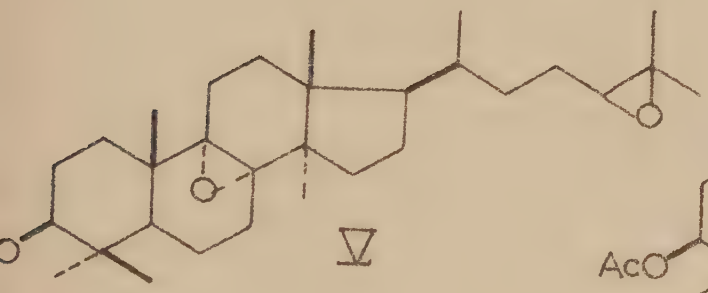
IV

a R = 

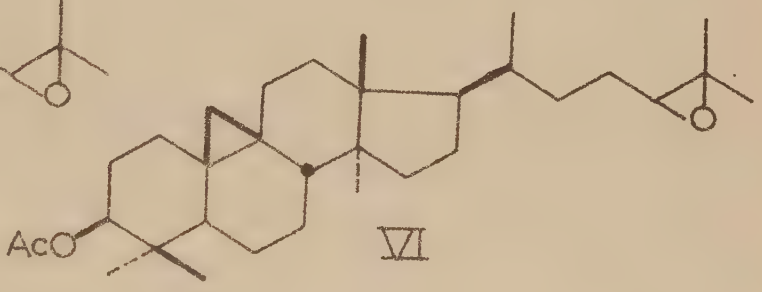
b R = 

c R =

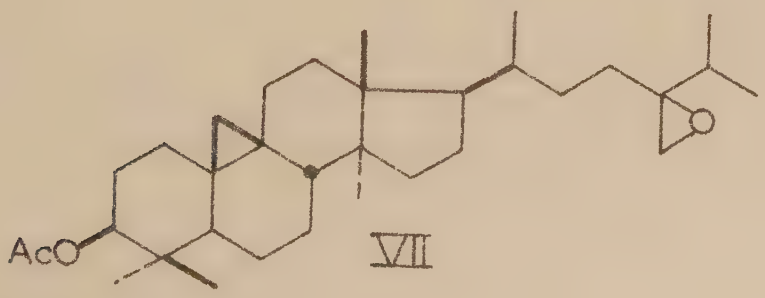
d R = =O



V



VI



VII

Dans le cas des tissus de ronce, d'endive et de carotte, les triterpènes sont acétylés, purifiés par chromatographie sur silice (sans séparation), puis époxydés et chromatographiés. On sépare ainsi directement les triterpènes pentacycliques (non étudiés ici), le methylène-24 cycloartanol, le cycloarténol et le lanostérol. Nous n'avons pas procédé, dans les cas de l'endive et de la carotte, à une recristallisation des acétates-époxydes de cycloarténol et lanostérol; dans ces cas plus encore que dans les autres, seul le premier produit présente une activité notable (Tableau 1).

La fraction de R_F correspondant à la lanostadiénone (étudiée sur des tissus de N.tabacum) est rechromatographiée, réduite au borohydrure de sodium, cochromatographiée avec du lanostérol entraîneur et recristallisée.

RECHERCHE DU LANOSTADIENE

Ce produit a même degré d'oxydation que le squalène qui s'accumule en anaérobiose (7); il était donc logique de penser que, dans ces conditions, on détecterait le plus facilement le lanostadiène ou éventuellement le cycloartène.

Les cultures de Nicotiana tabacum sont mises en milieu liquide; on fait barboter de l'azote stérilisé par des filtres "Millipore" pendant I/2 h; puis on fait un vide partiel à la trompe à eau pendant quelques secondes, remet de l'azote et répète l'opération 5 à 6 fois. On rajoute l'acétate 1-^{14}C (50μC) par une seringue munie d'un filtre "Millipore" pour stériliser la solution, à travers un diaphragme de caoutchouc. On laisse incuber 4 h sous un faible courant d'azote. Pour éviter une aérobiose partielle par l'oxygène de l'air pendant le lavage des cultures, avant de prélever celles-ci on plonge le ballon fermé, pendant 20 mn dans l'eau bouillante, de façon à tuer les cultures. Cette méthode à

donné de très bons résultats (moins de 5% de produits actifs autres que les hydrocarbures par rapport à l'activité de l'extrait à l'éther de pétrole).

Après lyophilisation, extraction à l'éther de pétrole et addition de lanostadiène entraîneur *, on chromatographie dans le système cyclohexane-acétate d'éthyle (4-1): les hydrocarbures sont élués, puis rechromatographiés avec du cyclohexane pur: on sépare ainsi nettement le lanosta-8,24-diène et le squalène.

RESULTATS

RECHERCHE DU LANOSTEROL

Nous avons rassemblé les résultats des trois séries dans les deux tableaux suivants:

TABLEAU I page 25

Dans le cas de Dioscorea composita, un spectre de masse nous avait indiqué la présence, en quantité importante, de β-amyrine (IVa) dans les triterpènes**. Il faut aussi remarquer la très forte activité du méthylène-24 cycloartanol par rapport à celle du cycloarténol, dans ce tissu. L'époxydation de la fraction "acétate de cycloartényle", suivie de chromatographie sur plaque, permet de séparer très facilement les acétates-époxydes de cycloartényle et de lanostéryle.

---

* Nous devons ce produit à l'obligeance du Dr. P.PESNELLE (Institut de Chimie, Strasbourg)

** Dans les autres cas, nous n'avons pas caractérisé les triterpènes pentacycliques, cochromatographiés avec la β-amyrine.

Le tableau II résume nos résultats.

TABLEAU II page 26

Ces résultats sont nets et montrent que par nos méthodes, nous ne détectons pas de lanostérol marqué.

RECHERCHE DE LA LANOSTADIENONE

La fraction contenant la lanostadiénone non active ayant été rechromatographiée successivement dans différents systèmes de solvants pour enlever les contaminants ne présente plus d'activité notable. Il en est de même du lanostérol obtenu comme indiqué ci-dessus (Méthodes). La lanostadiénone n'est donc pas décelable par nos méthodes. Notons d'ailleurs que la cycloarténone n'aurait pas été séparée de son isomère, et qu'elle n'est par conséquent pas non plus décelable.

RECHERCHE DU LANOSTADIENE

Alors que le squalène est très marqué (5.10^5 c/mn), on détecte à peine 600 c/mn dans le lanostadiène brut isolé (activité spécifique 10 c/mn/mg par addition de 60 mg d'entraîneur); après recristallisation, cette activité spécifique tombe à environ 3 c/mn/mg; elle est trop faible pour avoir encore une signification.

CONCLUSION

Il semble donc que le lanostérol soit bien absent des tissus étudiés, ainsi que ses équivalents, l'hydrocarbure Ic ou la cétone Id. Par contre, le cycloarténol et le méthylène-24 cycloartanol sont toujours détectés.

A première vue, ceci suggère que dans les plantes supérieures étudiées le cycloarténol pourrait remplacer le lanostérol dans la biosynthèse des phytostérols *.

Mais il se poserait alors le problème très important de l'ouverture du cyclopropane qui doit nécessairement mener à des produits insaturés que nous n'avons pas encore mis en évidence. Nous avons en route diverses expériences tendant à approfondir les problèmes métaboliques posés par la présence du cycloarténol et l'absence de lanostérol dans tous les systèmes que nous avons étudiés.

---

* GOAD et GOODWIN (14), se basant uniquement sur des expériences très voisines des nôtres, ont d'ailleurs postulé la chaîne: squalène, cycloarténol, méthylène-24 cycloartanol, cycloeucalénol, méthylène-24 lophénol, éthylidène-24 lophénol, β-sitostérol.

(14) L.J. GOAD et T.W. GOODWIN, Biochem. J. 99, 735 (1966).

TABLEAU I

	Feuille de Tabac	D. composita	A. toumeyana	Ronce	Endive	Carotte
Poids sec de matériel utilisé	-	2 g	0,45 g	0,85 g	0,60 g	0,70 g
Activité solution d'incorporation	600 µC	200 µC	100 µC	100 µC	100 µC	100 µC
Activité éther de pétrole	$4,1.10^6$ cpm	13.10^6 cpm	$3,8.10^6$ cpm	13.10^6 cpm	15.10^6 cpm	8.10^6 cpm
Activité insaponifiable	$1,8.10^6$	$1,4.10^6$	$0,3.10^6$	4.10^6	6.10^6	2.10^6
Activité triterpènes purifiés	4.10^4	$1,7.10^5$	3.10^4	4.10^5	2.10^4	$4,5.10^4$
Activité phytostérols	2.10^5	$4,5.10^5$	$5,4.10^4$	4.10^5	$3,5.10^5$	2.10^5
Activité acétate de β-amyrine		$1,4.10^4$		10^5 x	$3,7.10^3$ x	
Activité acétate de méthylène-24 cycloartanyle		8.10^4		9.10^4 x	3.10^3 x	$2,8.10^3$ x
Activité acétates de cycloartényle et de lanostéryle	$3,2.10^4$	$3,4.10^4$	1.10^4	*{5.10^4 x 2.10^3	*{1.10^4 x 6.10^2	*{$1,7.10^4$ x 5.10^2

x Produits isolés après époxydation

* {Acétate Epoxyde de Cycloartényle
{Acétate Epoxyde de Lanostéryle

TABLEAU II

	Nombre de recristallisations	Feuille de Tabac	D.composita	A.toumeyana	Ronce
Acétate-époxyde de cycloartényle	1	3250 cpm/mg	770 cpm/mg	78 cpm/mg	70 cpm/mg
	2	3600 cpm/mg	710 cpm/mg	85 cpm/mg	69 cpm/mg
	3		750 cpm/mg	87 cpm/mg	75 cpm/mg
Acétate-époxyde de lanostéryle	1	250 cpm/mg	33 cpm/mg	10 cpm/mg	20 cpm/mg
	2	bruit de fond	bruit de fond	bruit de fond	5 cpm/mg x

x Le sommet du pic de radioactivité, très faible, est ici légèrement décalé par rapport au pic de masse. Il doit s'agir d'une impureté faiblement marquée et de R_F voisin de l'acétate-époxyde de lanostéryle.

CHAPITRE II.

INCORPORATION DE CYCLOARTENOL

ET DE LANOSTEROL

DANS LES TISSUS DE TABAC CULTIVES IN VITRO

-o-o-o-o-o-

La suite logique de ce travail consistait évidemment à essayer d'incorporer du cycloarténol et du lanostérol radioactifs et à voir lequel des deux est effectivement métabolisé. Nous avions le choix entre la préparation de produits tritiés en 2 (assez faciles à faire) ou marqués au carbone-14.

I . PRODUITS TRITIES.

Nous les avons préparés en collaboration avec Mme. M.F.LHOMME, le Pr.CORSANO et Mr. G.TELLER. BLOCH avait déjà montré (106) que dans le foie de rat le lanostérol-2T donnait du cholestérol-2T sans perte de tritium.

Pour effectuer les incorporations, nous avons procédé de deux façons:

-incorporation de 3-5 jours sur milieu liquide.

-incorporation de plusieurs semaines sur milieu solide.

Dans le cas du lanostérol, l'activité des stérols purifiés par acétylation et époxydation a toujours été négligeable.

Dans le cas du cycloarténol, seule une expérience nous a permis d'avoir assez d'activité pour purifier les stérols. Nous avons pu les recristalliser à activité spécifique constante (300, 212, 209, 205 cpm/mg), ce qui montre que le cycloarténol a bien été métabolisé par les tissus; mais le rendement est très faible.

Les incorporations sur milieu solide d'une durée de plusieurs semaines n'ont pas permis d'augmenter le rendement.

Ces rendements faibles sont dus à plusieurs facteurs défavorables:

-solubilité faible et dispersion des précurseurs dans le milieu.

-diffusion ralentie dans le cas du milieu solide.

Partie expérimentale.

a) Cycloarténol tritié.

85 mg de cycloarténone sont dissous dans 0,2 ml de tétrahydrofurane (THF); on y ajoute 0,1 ml d'une solution de potasse à 5% dans l'éthanol, puis 85 µl d'eau tritiée (soit 300mC).

On chauffe en ampoule scellée pendant 15 h à 65°C.

Après ouverture de l'ampoule refroidie, on ajoute de l'eau; la cétone précipitée est lavée à l'eau, redissoute dans le THF, reprécipitée.

La réduction de la cétone dissoute dans le THF anhydre se fait par le borohydrure de sodium dans l'éthanol à chaud pendant 20 mn.

Après addition d'eau et extraction à l'éther, on recristallise l'alcool du méthanol (3 fois). On obtient ainsi 31 mg de cycloarténol à 16 µC/mg.

En fait, par chromatographie sur couches minces, on peut séparer 2 bandes, la plus faible étant probablement du 3α -hydroxycycloarténol (par oxydation chromique, on obtient de nouveau la cétone).

b) Lanostérol tritié.

On obtient 23 mg de lanostérol à 20 µC/mg.

On ne détecte pas d'alcool 3α . La conformation du cycle A des 2 cétones a donc une grande influence sur le déroulement de la réduction.

c) Incorporation.

Dans une première série d'essais, les triterpènes étaient dissous dans de l'acétone, qui devait être éliminée du milieu avant l'addition des cultures en raison de sa toxicité. Pour ceci, après autoclavage de la solution, on y faisait passer un courant d'air stérilisé

par des filtres "Millipores" et humidifié par passage dans de l'eau stérile (pour éviter le dessèchement du milieu). Après 5 h, les cultures étaient rajoutées et l'incorporation était faite de la façon habituelle.

En raison de la complexité de la méthode, nous avons remplacé l'acétone par de l'alcool à 96 % beaucoup moins toxique, mais moins bon solvant des précurseurs.

Les stérols extraits à l'éther de pétrole sont purifiés et acétylés de la façon décrite au chapitre I pour les triterpènes. Après addition d'acétate de β-sitostéryle, on recristallise du méthanol.

Pour les incorporations sur milieu solide, la solution alcoolique de triterpènes est ajoutée au milieu chaud, l'ensemble est coulé dans des fioles de Fourneau et autoclavé 5 mn à 100°C. Après refroidissement, on ajoute les tissus et les laisse pousser pendant 7 semaines; au bout de ce temps, on les prélève et les traite de la manière habituelle.

II . PRODUITS MARQUES AU CARBONE-14.

Pendant que nous effectuions ces travaux, C.E. MURPHY préparait du cycloarténol et du lanostérol 25-^{14}C à partir d'acétone 2-^{14}C. Nous avons alors repris nos expériences d'incorporation sur milieu solide, en modifiant la technique d'addition du précurseur: au lieu de le dissoudre dans le milieu nutritif, nous le mettons en solution dans de l'alcool à 96% et déposons cette solution directement sur la culture avec une micropipette. La zône traitée est ensuite protégée par une solution d'huile de silicone dans l'éther de pétrole pour éviter une oxydation du précurseur.

Les résultats de ce travail effectué en collaboration avec M.J.E. HEWLINS ont été publiés dans European J. Biochemistry 8, 184 (1969); nous reproduisons ci-après le texte complet de cet article.

THE CONVERSION OF ^{14}C-CYCLOARTENOL AND ^{14}C-LANOSTEROL INTO PHYTOSTEROLS BY CULTURES OF NICOTIANA TABACUM

M.J.E. HEWLINS, J.D. EHRHARDT, L. HIRTH and G. OURISSON

Département des Applications Biologiques du Centre de Recherches Nucléaires, Strasbourg-Cronenbourg, France

---

Tissue cultures of Nicotiana tabacum were treated with (14-C)-cycloartenol and (14-C)-lanosterol, and the 4,4-dimethylsterols, 4-methylsterols and phytosterols fractions were examined for radioactivity. In both cases activity was incorporated into the phytosterols.

The distributions of radioactivity in the 4,4-dimethylsterols and 4-methylsterols were compared with those obtained by incorporation of (14-C)-acetic acid. It is concluded that cycloartenol is a true phytosterol precursor in the tissue cultures, whereas the possible role of lanosterol (not detectable in the cultures, even by isotopic dilution experiments) is not proven.

The probable importance of cycloartenol (I) in the biosynthesis of phytosterols was summarised in the preceding article which demonstrated the conversion of 2,3-oxidosqualene into cycloartenol in tobacco tissue(1). The present article describes the incorporation of cycloartenol and lanosterol (II), labelled with ^{14}C at C-25, to determine whether one or both of these triterpenes could be converted into phytosterols by cultures of Nicotiana tabacum.

MATERIALS AND METHODS

-Preparation of Labelled Precursors

(25-^{14}C) Cycloartenol and (25-^{14}C) lanosterol were prepared in this laboratory by Dr. C.E. Murphy(2), by a Wittig reaction of (2-^{14}C) acetone on the corresponding 24-ylids. The specific activities of the products were 2.08 and 3.87 μC/μmole respectively.

-Incorporation Experiments

The cultures of Nicotiana tabacum have been described before(3). In a typical experiment, three cultures (about 5 g fresh weight) were each cut into three portions and grown on a solid Knop medium in Petri dishes. The precursor (e.g.7X10^{6}counts/min, in 180 μl 95% ethanol) was dropped on to cultures, followed by 0.36 ml of a solution of silicone oil (DC-200) in petroleum ether (30%, by vol). This procedure serves to protect the precursor from aerial oxidation during the incorporation. The method has been successfully used in work with whole plants (see(3a) and other papers by the same authors). All operations were carried out under sterile conditions. After one week the cultures were collected, washed with water, lyophilised and extracted (Soxhlet) with petroleum ether (300 ml, 7h) after addition of carrier material consisting of 1 mg each of cycloartenol, lanosterol, cycloeucalenol and obtusifoliol, and 0.5mg each of 24-methylene-cycloartanol and 24-methylenelanost-8-enol.

The isotopic dilution experiments were carried out in a similar manner. Ten cultures were treated with unlabelled lanosterol (0.8mg, in 600 μl 95% ethanol) followed by the silicone oil solution (1.2ml). After 1 week, (^{14}C) acetic (36 μC/μmole, 20uC made up to 1.5ml in Knop solution) was added each 2 h five times, or (^{14}C) mevalonic acid (5.5 μC/μmole, 12.5 μC, made up to 1.5 ml in Knop solution) was added each 2 h four times. In each case the experiment was terminated 2 h after the final addition, and the cultures were extracted as above.

-Analysis of Extracts

The petroleum ether extracts were analysed by preparative thin layer chromatography using methods previously described(4). All chromatograms were scanned with a Berthold radiochromatogram scanner (capable of detecting approx. 1,000 dis./min of ^{14}C) to check the correspondence of radioactivity with carrier bands (visualised by fluorescence after spraying with berberine hydrochloride). After elution, the products were counted by means of a Packard liquid scintillation counter 314 E, with an efficiency of 63% for ^{14}C.

Specific activities were determined by means of (^{3}H) acetic anhydride as described elsewhere(5).

-Degradation of Stigmasterol IX

Stigmasterol diepoxyacetate obtained from the incorporation of cycloartenol (see below) was mixed with carrier material (2mg), periodic acid (dihydrate, 3 mg), water (1 ml) and methanol (2 ml). The mixture was refluxed for 45 min (some iodine was liberated), cooled, added to a solution (3 ml) of2,4-dinitrophenylhydrazine in hydrochloric acid (4N) and allowed to stand overnight. Water (10 ml) was added and the solution was extracted with petroleum ether. The extract was chromatographed on silica gel developed with ethyl acetate in cyclohexane (10%, by vol). The 2,4-dinitrophenylhydrazone (about 0.5 mg) of 2-ethyl-3-methylbutyraldehyde moved with R_F 0.5 (identical with an authentic specimen, m.p. 111-6°, prepared by ozonisation of stigmasterol). For counting, a one-tenth aliquot was taken (quenching is very slight at this concentration).

The product containing the steroid nucleus had an R_F of 0.4. In a similar run using stigmasteryl diepoxyacetate biosynthesised from (^{14}C) acetic acid, most of the recovered activity was in this band. The starting material has an R_F of 0.3 in the system used.

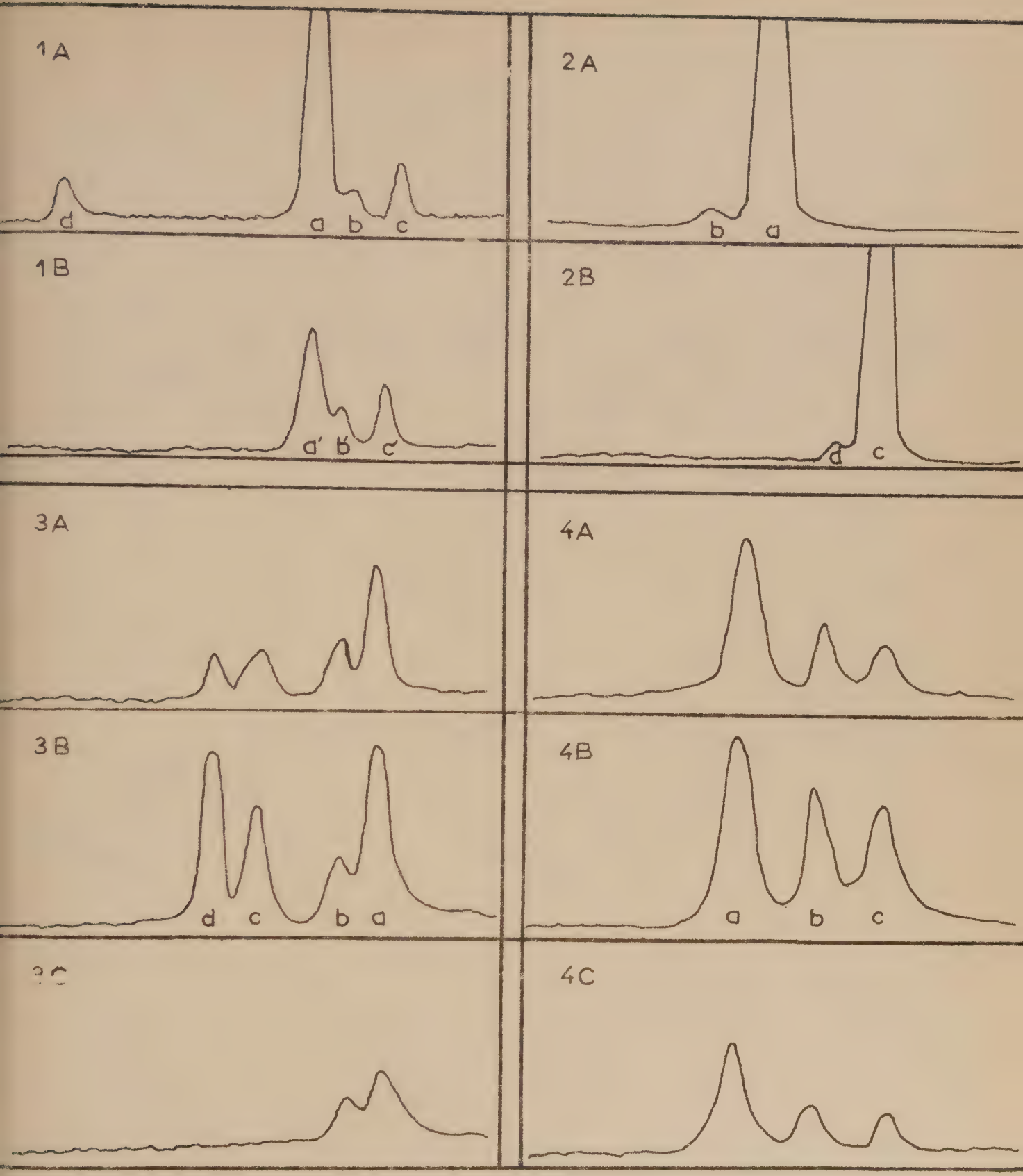
RESULTS.

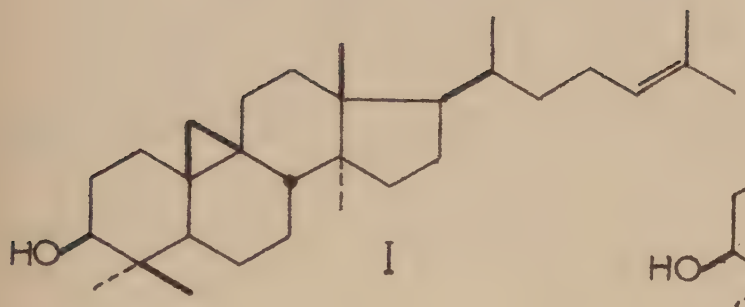
-Incorporation of Cycloartenol

Fig.1A shows the radiochromatogram of the petroleum ether extract of an incorporation of cycloartenol. Activity is found in the region of the three carrier bands of 4,4-dimethylsterols (a), 4-methylsterols (b) and phytosterols (c), and in a fast-moving band (d).This last band contains esters(6), and after saponification all the radioactivity was found in the three free steroid bands (a',b',c',Fig.1B). Repeated chromatography of all the bands (a, b,c; a',b',c') gave radiochemically pure fractions. After acetylation and further chromatography the radioactivity of each fraction remained with the carrier acetates.

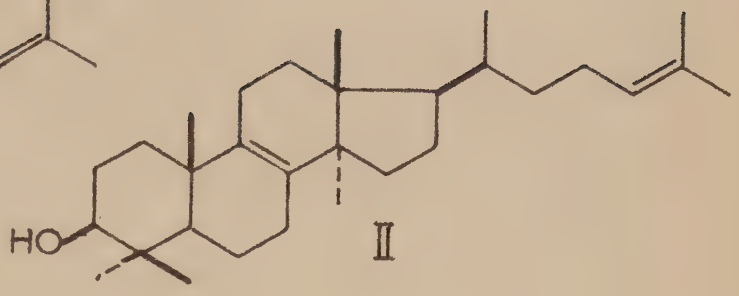
The acetates of the 4,4-dimethylsterols (a) were separated by chromatography on silica gel containing 10% $AgNO_3$ into two regions. The first contained a mixture of the acetates of cycloartenol and lanosterol, the second contained a mixture of their 24-methylene-24,25-dihydro derivatives (III and IV). Each mixture was rechromatographed and epoxidised. Fig. 2A shows the repartition of radioactivity in the epoxides. Cycloartenol (a) is heavily labelled, and activity is detectable in 24-methylene-cycloartanol (b), but thelanosterol derivatives are unlabelled. Similarly, direct epoxidation of the acetates of 4,4-dimethylsterols (a' of Fig.1), derived from the ester fraction, gave two radioactive bands, corresponding to the epoxy-acetates of cycloartenol and 24-methylene-cycloartanol.

The acetates of the 4-methylsterols (b and b' of Fig.1) from several experiments were mixed and epoxidised. Fig.3A shows the radiochromatogram of the epoxy-acetates, with a similar diagram (Fig.3B) for an incorporation of (^{14}C) acetic acid for 16 h. The repartition of activity is very similar in the two cases. The four fractions have been characterised (Fig.4B), and correspond to (a) a mixture of 24-methylene and 24-ethylidenelophenol (V, R=H,Me), (b) obtusifoliol (VI), (c) a

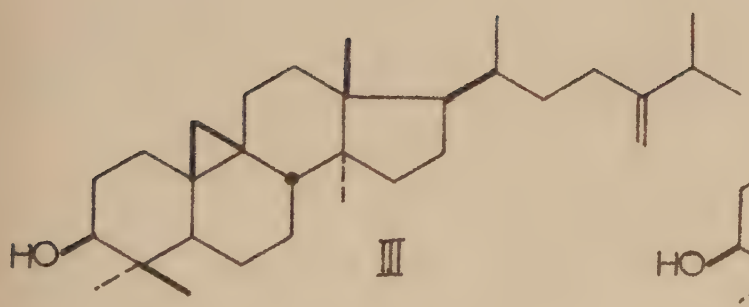

1A
d
a b c
2A
b a
1B
a b c
2B
d c
3A
4A
3B
d c b a
4B
a b c
4C



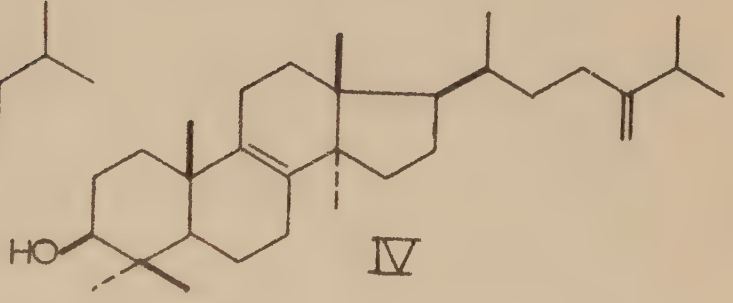
I



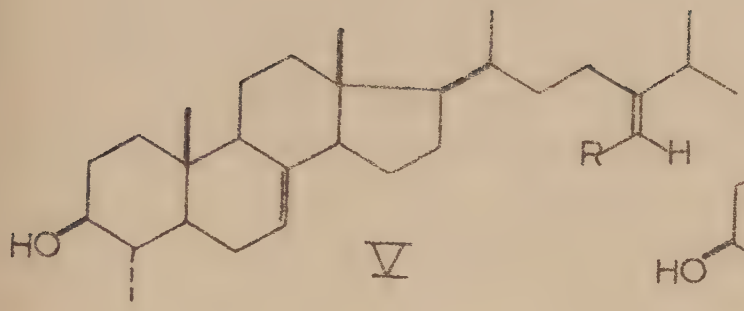
II



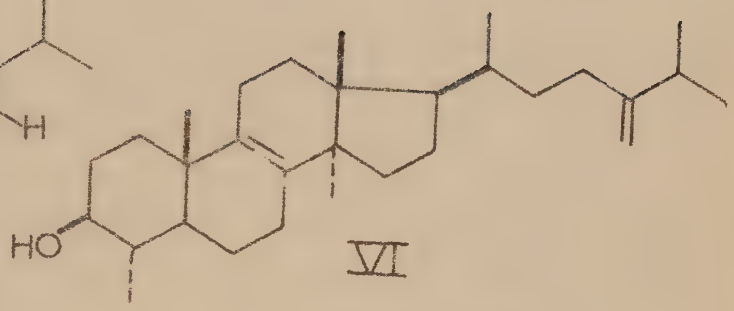
III



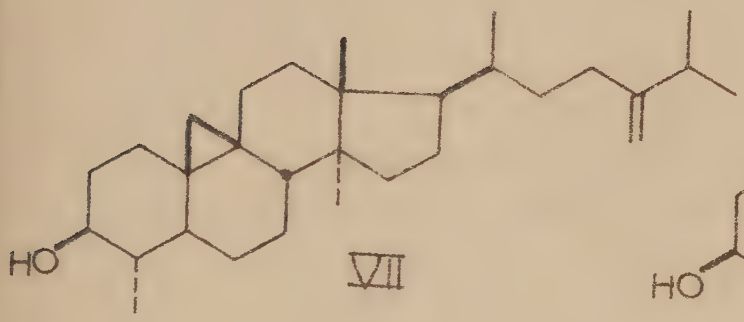
IV



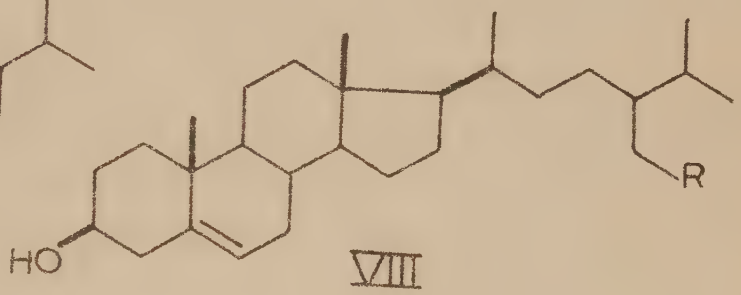
V



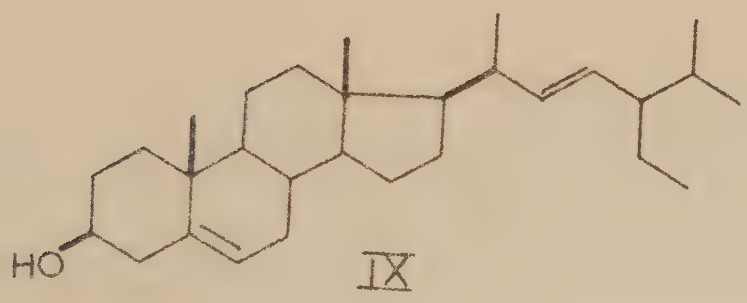
VI



VII



VIII



IX

fraction whose identity is now being studied, and (d) cycloeucalenol (VII).

The acetates of phytosterols (c of Fig.1) were separated by thin layer chromatography on silica gel/$AgNO_3$ into three bands. The major radioactive peak (a, Fig.4A) contains β-sitosterol (VIII, R=Me), campesterol (VIII, R=H) and stigmasterol (IX). The minor peaks correspond to two minor sterols, 24-methylene-cholestenol (c) and 24-ethylidene-cholestenol (b)[1]. For comparison Fig. 4B shows a diagram corresponding to a long incorporation of (^{14}C)-acetic acid. The major fraction (a) was epoxidised (7,7a); all the activity remained with the mixed monoepoxy-acetates of β-sitosterol and campesterol, and with the diepoxy-acetate of stigmasterol. The minor fractions (b and c) were accumulated over several experiments, and then epoxidised using fucosteryl acetate as a "pseudo-carrier". All the activity remained with the diepoxyacetate of fucosterol.

No activity was detected in squalene or in 2,3-oxidosqualene. This suggests that the observed incorporation into the phytosterols does not occur by a previous degradation to acetic acid. To confirm this point, the epoxy-acetate of the stigmasterol produced was oxidised by periodic acid. From 2,520 counts/min of starting material, 1,440 counts/min were recovered in the 2,4-dinitrophenylhydrazone of 2-ethyl-3-methyl-butyraldehyde, whereas no activity was detectable in the product containing the steroid nucleus. The radioactivity, at C-25 in the precursor, is therefore not scrambled in stigmasterol, an presumably not in any of the other compounds isolated.

---

[1] The assignment of the radioactive peaks is not completed. The peak b cochromatographs with 24-ethylidene-cholest-7-enyl acetate (slightly lower then the Δ^5-compound), and the peak c runs slightly below 24-methylene-cholest-7-enyl acetate. These minor sterols (approx 3% of the total sterol fraction) from untreated cultures have been examined by mass spectroscopy, which shows the presence of 24-methylene- and 24-ethylidene-7-enol, as well as of the two Δ^5compounds which are in the largest amount. On epoxidation with fucosteryl acetate as a "pseudo-carrier", the radioactivity of peaks b and c runs with the diepoxy-acetate of fucosterol.

The repeated correspondence of radioactivity with carrier bands during all chemical and chromatographic processes is good evidence of the incorporation of the precursor into the products. From cycloartenol, all the products are labelled, that are labelled from acetic acid.

-Incorporation of Lanosterol

The procedure was identical with that used for the cycloartenol case. The 4,4-dimethylsterols, 4-methylsterols and phytosterols were again labelled, as were esterified forms of these.

The labelling of the 4,4-dimethylsterols is however very different from the cycloartenol case. Fig. 2B shows a strong peak due to lanosterol (c), and some activity runs with 24-methylene lanost-8-enol as acetate on silica gel/$AgNO_3$ and as diepoxyacetate (d) on silica gel. This latter compound, like lanosterol itself, has not been identified in the tissue cultures in labelling experiments from acetic or mevalonic acids.

The 4-methylsterols also show a difference from the cycloartenol case. Fig.3C shows the epoxy-acetates. Only compounds giving diepoxides are labelled, though the low activities prevent further study. The cycloartane derivatives (regions c and d) are not detectably labelled.

In contrast, the incorporation of lanosterol gave exactly the same mixture of phytosterols as is obtained from cycloartenol and acetic acid (Fig. 4C).

The absence of activity in cycloartenol excludes the possibility of a degradation followed by a normal biosynthesis.

-Efficiencies and Dilutions

Table 1 shows the activities found in the various acetate fractions in four pairs of experiments, each carried out in parallel. In each case the efficiency (quoted as total activity in phytosterol acetates divided by activity of precursor administered) is appreciably higher with cycloartenol than with lanosterol, but remains quite low.

In one pair of experiments (No.4 of Table 1), the specific activities of the various phytosterols were measured using the technique of acetylation with (^{3}H) acetic anhydride (5). Table 2 shows the results. The dilutions at the level of stigmasterol (specific activity of stigmasterol divided by that of precursor) are 450 and 1,500 for the incorporations of cycloartenol and lanosterol respectively.

-Preincubation of Lanosterol

The above experiments indicate that lanosterol is absorbed and metabolised by the tissue cultures although it is not normally détectable. We have carried out preincubations of unlabelled lanosterol under the same conditions, and followed these with long and continuous feeding of (^{14}C) acetic and mevalonic acids. The extracts were analysed exactly as described above. The radioactivities measured in cycloartenyl epoxyacetate were 993,000 and 170,000 counts/min respectively, whereas the radioactivity in lanosteryl diepoxyacetate fell to the background level (30 counts/min, for a 1/10th. aliquot) after two crystallisations. Therefore, if lanosterol is formed transiently in sterol biosynthesis, any exchange with exogenous lanosterol cannot be revealed by our technique.

Table 1

Expt.no.	Precursor administered	Radioactivity	Radioactivity in sterols isolated			Efficiency[a]
			4,4-Dimethyl steryl acetates	4-Methyl steryl acetates	Phyto-steryl-acetates	
		counts x 10^{-6}/min	counts x 10^{-3}/min			%
1	Lanosterol	2.5	191.15	1.2	3,0	0.12
	Cycloartenol	2.0	70.0	1.8	7,0	0.35
2	Lanosterol	10,0	426.0	2.0	7.5	0,08
	Cycloartenol	7,0	140.0	2.5	7.0	0,10
3	Lanosterol	9,9	2,500.0	4,7	12,4	0.13
	Cycloartenol	7.4	886.0	4,1	25.5	0.35
4	Lanosterol	8,0	1,860.0	1,63	13,8	0.17
	Cycloartenol	5.0	223.4	4.25	46.0	0.90

[a] $\text{Efficiency} = \frac{\text{Total activity in phytosteryl acetates}}{\text{Activity of precursor added}} \times 100.$

Table 2

	Incorporation of lanosterol	Incorporation of cycloartenol
	Specific activities	
	µC/µmole	
24-Methylene-cholestenol	0.018	0.084
24-Ethylidene-cholestenol	0.013	0,064
Δ-Sitosterol and campesterol	0.003	0,012
Stigmasterol	0,0025	0.005

DISCUSSION

Cycloartenol is present naturally in tobacco tissue cultures. The present results show that exogenous cycloartenol is, in fact, converted by the cultures into all the expected compounds. Thus, cycloartenol fulfils all the criteria that can be applied to a proposed intermediate.

The possibility of a route involving lanosterol cannot be ruled out. Lanosterol is found in higher plants only in exceptional case (7) and cannot be detected in tobacco tissue cultures even using the most sensitive techniques (cf.(4) and the attempted isotopic dilution experiments described here). Our limit of detection is probably less than 0.1% of the total triterpene fraction. If lanosterol plays a role in the biosynthesis it must have a very high turnover rate or remain attached to some site in the cell. The observed conversion of lanosterol into phytosterols may be due to a lack of specificity in the enzymes responsible for methylation at C-24 (cf. the in vitro system of Nes and coworkers (8) and demethylation at C-4. The former reaction produces 24-methylene-lanost-8-enol, a compound identified in our experiments with lanosterol as added precursor, though not normally detected in the cultures; the latter reaction then produces obtusifoliol (VI), a normal precursor on the route from cycloartenol to phytosterols. The direct incorporation of lanosterol is not sufficient evidence for its intermediacy in the biosynthesis. Other workers have demonstrated the conversions of lanosterol (9) and 24-methylene-lanost-8-enol (10) into phytosterols in higher plants. In these cases, as in our incorporation of lanosterol, the possible rôle of precursor in the natural biosynthesis remains to be confirmed.

REFERENCES

1. Eppenberger, U., Ourisson, G., and Hirth, L., European J. Biochem. 8 (1969) 180.
2. Murphy, C.E., Lhomme, M.F., Corsano, S., Teller, G., and Ourisson, G., unpublished work, 1968.
3. Hirth, L., Thesis, Paris 1958.
3a. Bennett, R.D., and Heftmann, E., Phytochem., 7 (1965) 775.
4a. Benveniste, P., Hirth, L., and Ourisson, G., Phytochem., 5 (1966) 45.
4b. Benveniste, P., Thesis, Strasbourg 1967.
4c. Ehrhardt, J.D., Hirth, L., and Ourisson, G., Phytochem., 6 (1967) 815.
5. Benveniste, P., Hewlins, M.J.E., and Fritig, B., unpublished work, 1968.
6. Kemp, R.J., Hamman, A.S.A., Goad, L.J., and Goodwin, T.W., Phytochem., 7 (1968) 447.
7. Ponsinet, G., and Ourisson, G., Phytochem., 4 (1965) 799.
7a. Ponsinet, G., and Ourisson, G., Phytochem., 6 (1967) 1235.
8. Russell, P.T., van Allen, R.T., and Nes, W.R., J. Biol. Chem. 242 (1967) 5802.
9. Baisted, D.J., Gardner, R.L., and McReynolds, L.A., Phytochem., 7 (1968) 945.
10. Devys, M., Alcaide, A., Barbier, M., and Lederer, E., Phytochem., 7 (1968) 613.

- - - - - - - - - - - - - -

Ajoutons que GOODWIN et coll. (107) ont obtenu des résultats identiques aux nôtres en incorporant du cycloarténol, du lanostérol et du méthylène-24 cycloartanol dans le poriférastérol de Ochromonas malhamensis.

De plus, DEVYS et coll. (108) ont réussi à obtenir du cholestérol par incorporation de cycloartanol dans Nicotiana tabacum; ce qui montre:

- la nécessité de la double-liaison en 24 pour les méthylations dans cette position.
- l'indépendance des enzymes agissant dans les cycles et sur la chaîne latérale.
- qu'il suffit que le cycloarténol endogène soit partiellement réduit en 24 pour expliquer la présence de petites quantités de cholestérol dans les plantes à côté des autres phytostérols.

CHAPITRE III.

ACTION DU PRODUIT "AY-9944"

SUR LA BIOSYNTHESE

DES PHYTOSTEROLS DES TISSUS

DE TABAC CULTIVES IN VITRO

_o_o_o_o_o_o_o

L'un des moyens utilisés pour étudier une chaîne biosynthétique est de fournir au système enzymatique sur lequel on travaille un produit qu'on présume faire partie de cette chaîne. C'est ce que nous avons fait avec le cycloarténol dans les tissus de tabac cultivés in vitro. Il y a cependant un risque: c'est le manque de spécificité de certains enzymes et nous avons vu que le lanostérol est lui aussi métabolisé (avec un rendement moindre).

Un autre moyen d'effectuer cette étude est de tenter de bloquer cette chaîne métabolique par différents moyens (inhibiteurs, anaérobiose, etc...); le risque, ici, consiste en une intoxication généralisée du système qui ne fonctionne plus du tout ou en des déviations métaboliques tout à fait inattendues. En ce qui concerne les risques d'intoxication, ils peuvent être réduits par une étude systématique des doses d'inhibiteurs à utiliser.

Nous allons rappeler ici un certain nombre de travaux sur la chaîne biosynthétique du cholestérol grâce à l'utilisation de l'anaérobiose et d'inhibiteurs.

La transformation de l'acétate en squalène est strictement anaérobie; mais ensuite, nous avons différents stades au niveau desquels l'anaérobiose peut jouer: l'oxydation du squalène en époxyde de squalène, les déméthylations oxydatives, la formation des diènes 5,7.

En incorporant de l'acétate-^{14}C dans les tissus de tabac maintenus sous anaérobiose, nous avons mis en évidence une très importante accumulation de squalène; alors que l'activité des triterpènes est réduite à 2-5% de sa valeur normale, il est possible que l'oxygène contenu dans les tissus n'ait pas été totalement éliminé et que, de ce fait, l'anaérobiose n'ait été que partielle.

EPPENBERGER et coll. (20) ont montré que l'époxyde de squalène est transformé uniquement en cycloarténol et méthylène-24 cycloartanol avec un rendement de 0,14% par des tissus de tabac sous anaérobiose; on ne détecte pas de méthyl-4α stérols ou de stérols marqués.

AKHTAR et coll. (113) montrent que l'ergostadièn-7,22 ol-3β est métabolisé en ergostérol en aérobiose par Saccharomyces cerevisiae, alors qu'en anaérobiose la transformation est négligable; ceci a aussi été démontré dans la biosynthèse du cholestérol (21, 110). Par contre, le passage des diènes 5,7 au cholestérol est strictement anaérobie (111).

Mais la plupart des travaux sur la biosynthèse du cholestérol ont été effectués avec des inhibiteurs:

- les uns agissent comme des inhibiteurs compétitifs: ce sont des produits très analogues aux produits de la chaîne biosynthétique et ils occupent probablement les sites actifs des enzymes: iminosqualène (15), analogues du cholestérol à chaîne latérale modifiée inhibant la réduction en 24 (112-114).
- les autres ont un mode d'action mal connu: rappelons le "SKF-7997" (19,20), le "Triparanol", l'"AY-9944". L'arsénite de sodium provoque l'accumulation de lanostadièn-7,24 ol-3β dans la peau du rat (115) comme s'il empêchait les déméthylations et la formation de la double-liaison en 5 qui sont toutes des réactions d'oxydation.

Cependant ces inhibiteurs, surtout ceux de la seconde catégorie, ont souvent des actions secondaires très notables.

BONNER et coll. (116) ont signalé que le "Triparanol" appliqué sur les feuilles de Xanthium pennsylvanicum ou de Pharbitis nil provoque des nécroses; le "SKF-7997" supprime la floraison, mais seulement s'il

est appliqué avant une période d'obscurité: il suffit, pour cela, de plonger les feuilles dans une solution à 2 mg/ml de "SKF-7997".

Le "Triparanol" inhibe la multiplication de certaines bactéries (131).

DENNIS et WEST (117) ont constaté que le "SKF-525" * inhibe l'oxydation du kaurénol 45a en kaurénal 45b dans Echinocystis macrocarpa.

DEYSSON a indiqué que la solution saturée de "Triparanol" dans du milieu Knop dilué deux fois (soit une concentration inférieure à 0,001%) provoque la mort des cellules d'Allinum sativum en moins de trois jours, après disparition des mitoses (118).

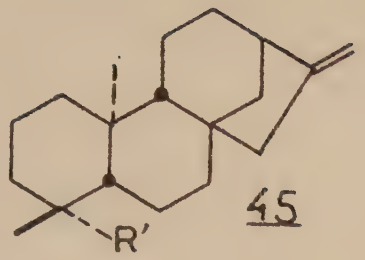
"AY-9944" inhibe la 11β-hydroxylation par des homogénats de surrénales: ceux-ci sont incapables de synthétiser la corticostérone 46a à partir de la progestérone 47b et de la désoxy-11 corticostérone 46b, alors que la transformation de la hydroxy-11β progestérone 47a en corticostérone se fait toujours (119).

L'incorporation de l'acide palmitique et de la choline dans les sphingomyélines est réduite par "AY-9944" chez le rat (120).

Ces quelques exemples montrent donc bien que l'utilisation des inhibiteurs n'est pas toujours facile et que, dans certains cas, il peut se produire des effets secondaires gênants.

---

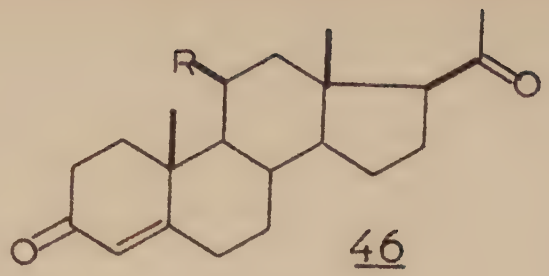
* SKF-525 = 2-diéthylaminoéthyl, 2,2-diphénylvalérate de sodium.



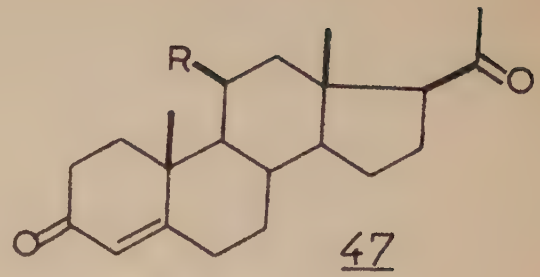
45

a $R'=CH_2OH$

b $R'=CHO$



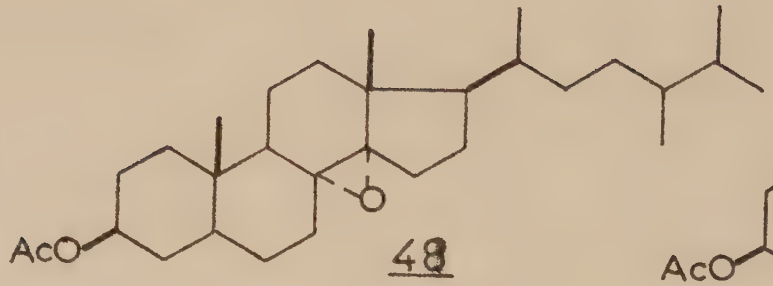
46



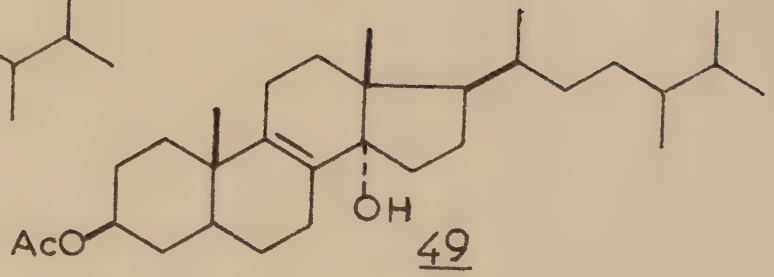
47

a R = OH

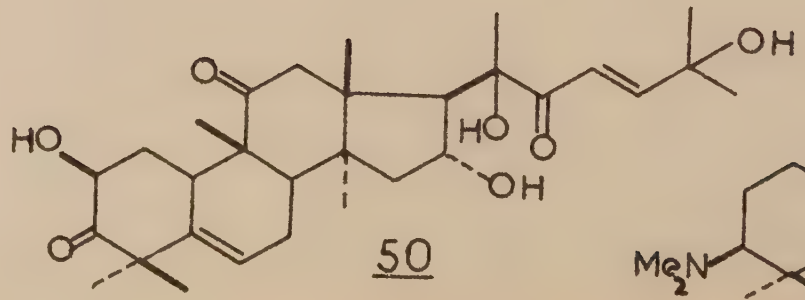
b R = H



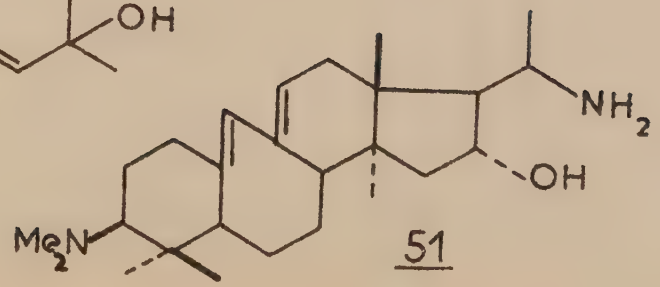
48



49



50



51

En vue d'étudier la biosynthèse des stérols de tissus de tabac cultivés in vitro, nous avons utilisé le produit "AY-9944". Ce produit étant soluble dans le milieu, nous n'avons pas eu les mêmes difficultés de solubilisation qu'avec le cycloarténol.

Les premières séries d'expérience ont été effectuées en ajoutant au milieu de culture (25ml) 40 mg d'AY-9944 (soit 10^{-4}M) et de l'acétate $-^{14}C$ (100µC), les cultures étant éclairées normalement. Après une nuit d'incorporation, les tissus sont traités et les stérols séparés selon le mode opératoire décrit dans la partie expérimentale.

Dans aucune de ces expériences, nous n'avons pu mettre en évidence de diènes 5,7 et ceci malgré toutes les précautions de manipulations observées (addition de diène non marqué, chromatographies sous azote et à l'obscurité pour éviter des oxydations). Cependant l'étude des activités spécifiques des stérols des tissus traités par rapport à celles des stérols des tissus témoins montre que le produit "AY-9944" a néanmoins une action très nette sur leur biosynthèse.

En effet, comme on peut le constater en comparant les colonnes T et AY1 du tableau VI, l'activité spécifique des produits à double-liaison en 7 est stable ou en augmentation en présence de "AY-9944"; par contre, celle des produits insaturés en 5 est en très forte diminution: ceci signifie que ces produits ne se forment plus qu'avec une vitesse très réduite par rapport au témoin.

La chaîne étant bloquée, on devrait constater une accumulation de diènes 5,7, mais il n'en est rien: il es possible que, sous l'influence de l'éclairage de la salle de culture, ces diènes soient transformés. Des travaux effectués au laboratoire du Professeur RAOUL, Faculté de Pharmacie, PARIS, ont montré que, lors de la germination de grains de maïs à l'obscurité, on détecte du cholestadièn-5,7 ol-3β , alors que si on opère sous ultra-violets le précalciférol et la vitamine D_3, produits d'irradiation normaux de ces diènes, sont mis en évidence.

Dans une deuxième série d'expériences (AY2), nous avons donné l'inhibiteur par doses successives: 5 mg le premier jour, puis 5 mg, 10 mg, 20 mg; le dernier jour, nous avons encore ajouté 100µC d'acétate-^{14}C. De plus on opère à l'obscurité.

Dans ce cas, nous sommes arrivés à mettre en évidence un produit possédant en chromatographie en couches minces sur silice imprégnée de nitrate d'argent des propriétés compatibles avec un système triénique-5,7,24. Ce produit, une fois hydrogéné et époxydé; se comporte de la même façon qu'un échantillon d'acétate de cholestadièn-5,7 yl-3β traité de la même façon. Malheureusement, la très faible quantité isolée (0,8γ évalué par comptage du tritium) n'a pas permis de connaître la nature de la ramification en 24 (méthylène ou éthylidène). Il ne peut pas s'agir d'acétate de méthyl-24 ou d'éthyl-24 cholestadièn-5,7 yl-3β, car ces produits sont moins polaires que le pic radioactif détecté sur plaques de silice au nitrate d'argent. Ceci est dû à l'action d'Ag^+ sur les doubles-liaisons: par exemple, le méthylène-24 cholestérol est retenu plus fortement que l'éthylidène-24 cholestérol qui à son tour est retenu plus fortement que le méthyl-24 ou l'éthyl-24 cholestérol.

Il semble donc qu'il y ait une très faible accumulation de diènes 5,7 dans les tissus traités à l'obscurité.

Dans le tableau VI, on constate que l'activité spécifique des diènes est inférieure à celle des méthylène-24 et éthylidène-24 cholestèn-7 ol-3β et supérieure à celle des cholestèn-5 ol-3β correspondants, ce qui est normal d'après leur place dans la chaîne biosynthétique.

On note une augmentation de l'activité spécifique des méthyl-24 et éthyl-24 cholestèn-7 ol-3β surtout dans les expériences AY1 (forte quantité d'inhibiteur). Nous proposons l'explication suivante, en admettant que la saturation de la chaîne latérale et la migration de la

TABLEAU VI.

	Témoin	AY 1	AY 2
? -24 cholestadièn-5,7 ol-3β			3640
méthylène-24 cholestèn-5 ol-3β	4000 *	530	1100
méthylène-24 cholestèn-7 ol-3β	8900	9000	8500
éthylidène-24 cholestèn-5 ol-3β	3100	120	400
éthylidène-24 cholestèn-7 ol-3β	7000	7800	6000
méthyl-24 & éthyl-24 cholestèn-5 ol-3β	100	5	5
méthyl-24 & éthyl-24 cholestèn-7 ol-3β	1000	5000	2000

*Activité spécifique exprimée en dpm/mμM.

double-liaison du cycle B sont indépendantes. Dans les tissus normaux, la voie majeure consisterait d'abord en la migration de la double-liaison du cycle B, suivie de la saturation de la chaîne latérale; dans les tissus traités, par contre, la migration étant bloquée à environ 90% , on aurait seulement la réduction qui interviendrait pour donner lieu à la formation de méthyl-24 et éthyl-24 cholestèn-7 ol-3β .

Ceci peut-être résumé dans le tableau VII ci-dessous.

TABLEAU VII.

TISSUS TEMOINS

méthylène-24 cholestèn-7 ol-3β ⟹ méthylène-24 cholestèn-5 ol-3β
↓ ↓
méthyl-24 cholestèn-7 ol-3β ⟶ méthyl-24 cholestèn-5 ol-3β

TISSUS TRAITES A "AY-9944"

méthylène-24 cholestèn-7 ol-3β ⟹ méthylène-24 cholestèn-5 ol-3β
↓ ↓
méthyl-24 cholestèn-7 ol-3β ⟶ méthyl-24 cholestèn-5 ol-3β

En conclusion:

Les stérols à diène 5,7 existent dans nos tissus, bien qu'à des concentrations extrêmement faibles, ce qui les rend difficiles à détecter; leur accumulation sous l'action de "AY-9944" est faible, contrairement à ce qui se passe dans le cas des tissus animaux. Ces stérols à diène 5,7 ont cependant déjà été mis en évidence dans diverses plantes et algues (non traitées à "AY-9944"), mais leur proportion par rapport au total des stérols varie de 5 à 15% (83-85), alors que dans nos tissus elle est de l'ordre de 0,1% et moins.

Comme dans les animaux, les stérols insaturés en 7 sont des précurseurs des stérols à double-liaison en 5. En effet, les faibles quantités obeservées signifient que ces produits sont transformés (puisqu' ils ne s'accumulent pas).

DEVYS et coll. (121) ont d'ailleurs montré que Nicotiana tabacum est capable de transformer du stigmastèn-7 ol-3β en β-sitostérol (stigmastèn-5 ol-3β), ce qui montre bien le rôle des stérols insaturés en 7

PARTIE EXPERIMENTALE.

Le milieu d'incorporation est le milieu de Knop dilué deux fois et stérilisé à l'autoclave. Le produit "AY-9944", dissous dans 1 ml de milieu, est ajouté au milieu préalablement stérilisé au moyen d'une seringue pourvue d'un filtre "Millipore"; ceci est fait pour éviter une éventuelle dégradation à l'autoclavage. L'acétate-^{14}C est ajouté de la même manière.

Après incorporation de l'acétate (une nuit en général), les tissus sont lyophilisés et extraits à l'éther de pétrole, et les stérols sont séparés par une chromatographie sur couche mince de silice.

Les stérols sont acétylés avec de l'anhydride acétique tritié (activité spécifique déterminée au préalable, variant de 15 à 30. 10^6 dpm/µ La mesure de l'activité en tritium des différents acétates de stérols permet alors de calculer leur quantité. Les acétates de stérols sont purifi par chromatographie sur silice, puis séparés sur plaques de silice imprégnée de 10% de nitrate d'argent et développées en continu pendant une nuit avec le mélange cyclohexane 80 - benzène 20. Pour ceci, la cuve de chromatographie est laissée entr'ouverte et un papier-filtre est fixé au haut de la plaque: de cette façon, le solvant arrivé en haut peut s'évaporer. Cette méthode permet de meilleures séparations que celle consistant à effectuer des chromatographies successives.

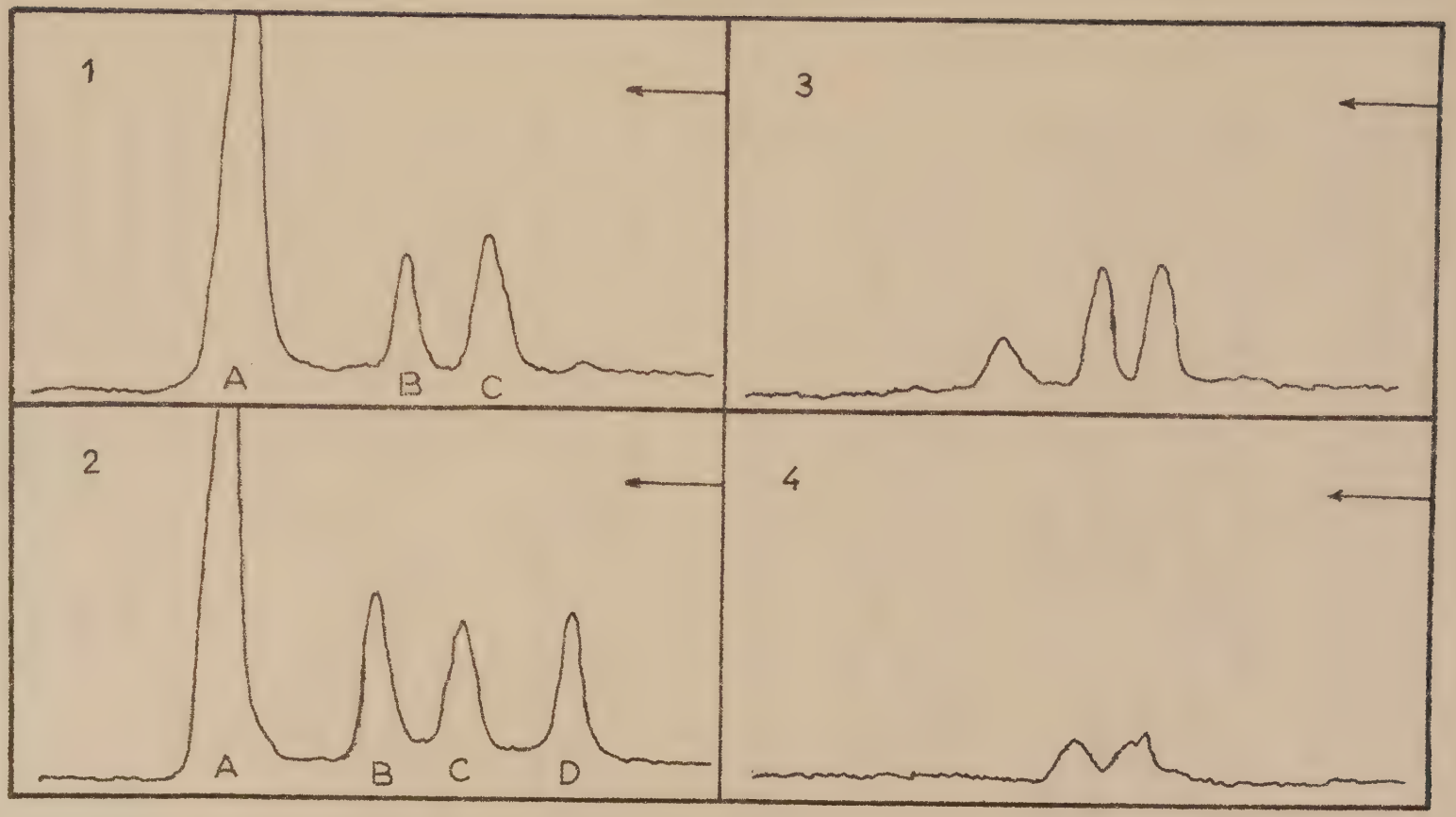
On sépare ainsi trois zônes radioactives dans le cas de AY1 et quatre dans le cas de AY2 (voir chromatogrammes 1 et 2).

-A correspond aux stérols à chaîne latérale saturée.
-B " " " " " éthylidène-24
-C " " " " " méthylène-24
-D peut correspondre à des produits à diène 5,7 et à chaîne latérale non saturée.

Les chromatogrammes correspondent à l'activité ^{14}C des produits, le tritium dû au groupement acétate étant éliminé par une fenêtre spéciale.

Nous avions vu par spectrométrie de masse (Chap. II) que les zônes B et C contiennent les stérols insaturés en 5 et ceux insaturés en 7. Pour séparer les différents produits, nous avons mis au point la méthode suivante:

-Après élution à l'éther, les produits de chaque zône active sont hydrogénés sur oxyde de platine dans l'acide acétique: les doubles-liaisons en 5 et 24 sont saturées et celles en 7 migrent en 8(14); dans le cas des diènes 5,7, les doubles-liaisons réagissent indépendemment l'une de l'autre.


1
A
B
C
3
2
A
B
C
D
4

-Le mélange obtenu est époxydé par l'acide p-nitroperbenzoïque dans l'éther: les produits saturés ne réagissent évidemment pas, alors que les produits insaturés en 8 (14) donnent deux produits, l'époxyde 48 et l'alcool allylique d'ouverture 49.

Pour la structure de l'alcool allylique, deux formules étaient possibles: celle du cholestèn-7 diol-3β,14α et celle du cholestèn-8(9) diol-3β,14α. Pour déterminer la structure de notre produit, nous l'avons deshydraté par action du chloroforme acide: nous obtenons ainsi un diène (UV λ_{max}=249,5 mμ ε=18300).

Dans la littérature , nous relevons (132):

ergostatrièn-7,14,22 ol-3β λ_{max}=242 mμ ε=9900

ergostatrièn-8(9),14,22 ol-3β λ_{max}=250 mμ ε=18000

Pour ces raisons, nous attribuons la structure 49 à l'alcool allylique de départ.

Pour séparer les différents produits de la réaction d'époxydation, il suffit de chromatographier le mélange après avoir éliminé l'acide p-nitroperbenzoïque par le carbonate de sodium.

Le chromatogramme 3 montre ce qu'on obtient à partir des zônes A,B,C: le produit le moins polaire dérive des stérols insaturés en 5, les deux autres produits proviennent des stérols insaturés en 7.
Dans le cas de la zône D, seuls les deux produits plus polaires sont observés. (chromatogramme 4)

Les différentes fractions sont alors éluées et comptées dans un spectromètre à scintillation liquide Intertechnique SL40.
Le comptage ^{14}C correspond à la quantité de produit formé à partir de l'acétate-^{14}C, alors que le comptage tritium correspond à la quantité totale de produit présent dans les tissus, c'est-à-dire à leur poids, qui peut être calculé connaîssant l'activité spécifique de l'anhydride acétique tritié utilisé.

CONCLUSION

Dans le premier chapitre et le tableau V, nous avons montré que le cycloarténol est très répandu dans toutes les familles végétales à l'exclusion des champignons.

Dans le deuxième chapitre, nous avons démontré la conversion in vivo du cycloarténol en stérols dans des tissus de tabac cultivés in vitro.

Le rapprochement de ces deux résultats nous amène à la conclusion que le cycloarténol est le précurseur triterpénique des stérols végétaux (à l'exclusion des champignons) et qu'il y joue le même rôle que le lanostérol dans le règne animal.

Comment expliquer la formation du cycloarténol? En effet, dans le cas de la transformation de l'époxyde de squalène en lanostérol, il n'y a pas de problèmes théoriques: après la cyclisation, une série de transpositions trans-antiparallèles d'hydrogènes et de méthyles, puis la formation de la double-liaison 8(9) s'expliquent aisément (122,123). Par contre dans le cas du cycloarténol, l'hydrogène 9β doit être déplacé par le méthyle en 10β. REES et coll. (124) ont montré que cet hydrogène 9β est transféré en 8: en effet, en incorporant de l'acide mévalonique (2-^{14}C, (4R)-4$^{3}H_{1}$) dans les feuilles de Solanum tuberosum, ils constatent que le rapport $^{3}H/^{14}C$ est 6/6 dans le cycloarténol comme

dans le squalène, alors qu'il y serait 5/6 si on était passé par le lanostérol. En d'autres termes, le lanostérol n'est pas un intermédiaire entre l'époxyde de squalène et le cycloarténol.

Il est possible que l'enzyme de cyclisation puisse compenser la déficience électronique en 9 par une liaison enzyme-C9; la rupture de cette liaison permettrait alors au groupe méthyle 19 d'attaquer en 9β pour former le cyclopropane. La formation du lanostérol ou du parkéol serait aussi explicable par ce mécanisme, mais ce serait les hydrogènes 8β ou 11β qui attaqueraient en 9.

En ce qui concerne le catabolisme du cycloarténol, il semble que celui-ci puisse jouer un rôle important dans la biosynthèse de plusieurs familles de produits. En effet, les trois liaisons du cyclopropane sont susceptibles de se couper et on connaît des produits naturels correspondants à ces trois types de coupures:

- la coupure de la liaison C10-C19 conduit à la famille des cucurbitacines (cucurbitacine D 50): ces produits ont un méthyle 9β .
- la coupure C9-C10 conduit à des produits à cycle B-homo tels certains alcaloïdes de plantes de la famille des Buxacées (buxaminol E 51).
- la coupure C9-C19 nous ramène dans les triterpènes de la série du lanostérol et de là aux stérols; cette coupure semble cependant ne pouvoir se faire dans les plantes qu'après une première déméthylation en 4 (mise en évidence de nor-31 cycloartanol et de cycloeucalénol).
- dans le pollinastanol où le cyclopropane est intact, le méthyle 14α n'est pas éliminé, ce qui indique la nécessité d'une insaturation dans les cycles B et/ou C pour permettre cette perte.

Notons encore que dans Buxus sempervirens et B. balearica coexistent des alcaloïdes à cyclopropane intact et d'autres à cycle B-homo

(par ex. 125-129); de plus dans B. sempervirens, VOTICKY et coll. (130) signalent un alcaloïde dont la partie cyclique est celle du cholestérol.

Le cycloarténol semble donc jouer le rôle de plaque tournante dans la biosynthèse de tous ces produits. Son rôle devrait être élucidé par des expériences d'incorporation sur les différentes familles de plantes, la coupure du cyclopropane dépendant des systèmes enzymatiques présents.

Dans les tissus de tabac cultivés in vitro, nous avons d'autre part mis en évidence des stérols à double-liaison en 7 ou à diène-5,7 et portant une ramification en position 24.

Ces stérols sont présents en quantités très faibles (quelques millicromoles pour 2g de tissus secs), alors que les stérols insaturés en 5 sont présents en quantités beaucoup plus grandes. De plus, les résultats obtenus avec l'utilisation de "AY-9944" et la corrélation avec les travaux faits sur les animaux nous font conclure que ces produits sont des précurseurs biogénétiques des stérols majeurs tels le campestérol, le β-sitostérol.

Nous avons donc vu que jusqu'à l'époxyde de squalène, la biosynthèse du cholestérol chez les animaux et celle des stérols des végétaux sont identiques. Au niveau des triterpènes, nous avons une première différence du fait de l'existence du lanostérol dans le premier cas et du cycloarténol dans le deuxième. Après deux déméthylations, faites dans l'ordre inverse, les deux chaînes sont de nouveau analogues jusqu'aux stérols.

La deuxième grande différence provient de la présence de ramifications en 24 dans le cas des stérols des végétaux.

Comme nous l'avons déjà relevé, le cycloarténol n'est présent que dans des organismes capables de synthétiser de la chlorophylle. En effet, bien que les tissus végétaux cultivés in vitro dont nous nous sommes servis soient jaunes, il leur est possible de synthétiser la chlorophylle si on les met sur un milieu de culture adéquat (milieu de SKOOG-MURASHIGE).

Par contre, les champignons et les animaux ne fabriquent ni cycloarténol, ni chlorophylle.

Y a-t-il une relation entre ces faits?

-=-=-=-=-=-=-=-=-
-=-=-=-=-=-
=-=-=

BIBLIOGRAPHIE

1. K. BLOCH et D. RITTENBERG - J. Biol. Chem. 145, 625 (1942)
2. K. BLOCH et D. RITTENBERG - J. Biol. Chem. 159, 45 (1945)
3. K. BLOCH et D. RITTENBERG - J. Biol. Chem. 160, 417 (1945)
4. W.O. GODTFREDSEN et S. VANGEDAL - Tetrahedron 18, 1029 (1962)
5. T.G. HALSALL, Sir E.R.H. JONES, G. LOWE et C.E. NEWALL - Chem. Comm. 685 (1966)
6. S. OKUDA, S. IWASAKI, K. TSUDA, Y. SANO, T. HATA, S. UDAGAWA, Y. NAKAYAMA et H. YAMAGUCHI - Chem. Pharm. Bull. 12, 121 (1964)
7. T. MURATA, M. SHINOHARA, T. HIRATA, K. KAMIYA, M. NISHIKAWA et M. MIYAMOTO - Tetrah. Lett. 103 (1968)
8. D.H.R. BARTON et G.P. MOSS - Chem. Comm. 261 (1966)
9. D.H.R. BARTON, A.F. GOSDEN, G. MELLOWS et D.A. WIDDOWSON - Chem. Comm. 184 (1969)
10. E. CASPI, J.M. ZANDER, J.B. GREIG, F.B. MALLORY, R.L. CONNER et J.R. LANDREY - J. Am. Chem. Soc. 90, 3563 (1968)
11. E.J. COREY, W.E. RUSSEY et P.R. ORTIZ de MONTELLANO - J. Am. Chem. Soc. 88, 475(1966)
12. E.E. van TAMELEN, J.D. WILLETT, R.B. CLAYTON et K.E. LORD - J. Am. Chem. Soc. 88, 4752 (1966)

13a E.E. van TAMELEN, R.P. HANZLIK, K.P. SHARPLESS, R.B. CLAYTON, W.J. RICHTER et A.L. BIRLINGAME - J. Am. Chem. Soc. 90, 3284 (1968)

13b R.B. CLAYTON, E.E. van TAMELEN et R.G. NADEAU - J. Am. Chem. Soc. 90, 820 (1968)

13c L.O. CROSBY, E.E. van TAMELEN et R.B. CLAYTON - Chem. Comm. 532 (1969)

14a E.J. COREY et S.K. GROSS - J. Am. Chem. Soc. 89, 4561 (1967)

14b E.J. COREY, K. LIN et M. JAUTELAT - J. Am. Chem. Soc. 90, 2724 (1968)

14c E.J. COREY, P.R.O. de MONTELLANO et H. YAMAMOTO -J.Am. Chem. Soc. 91, 2132 (1969)

15. E.J. COREY et P.R.O. de MONTELLANO - J. Am. Chem. Soc. 89, 3362 (1967)
16. W.O. GODTFREDSEN, H. LORCK, E.E. van TAMELEN, J.D. WILLETT et R.B. CLAYTON - J. Am. Chem. Soc. 90, 208 (1968)
17. H.H. REES, L.J.GOAD et T.W. GOODWIN - Tetrah. Lett. 723 (1968)
18. D.H.R. BARTON, A.F. GOSDEN, G. MELLOWS et D.A. WIDDOWSON - Chem. Comm. 1067 (196
19. W.W. REID - Phytochem. 7, 451 (1968)
20. U. EPPENBERGER, L. HIRTH et G. OURISSON - Europ. J. Biochem. 8, 180 (1969)
21. M.E. DEMPSEY - J. Biol. Chem. 240, 4176 (1965)
22. I.D. FRANTS,Jr. et G.J. SCHROEPFER,Jr. - Annual Rev. Biochem. 36(II), 691 (1967) et références citées

23. J.A. OLSON, I. LINDBERG et K. BLOCH - J. Biol. Chem. 226, 941 (1957)
24. J. FRIED, A. DUDOWITZ et J.N. BROWN - Biochem. Biophys. Res. Comm. 32, 568 (196
25a M. AKHTAR, I.A. WATKINSON, A.D. RAHIMTULA, D.C. WILTON et K.A. MUNDAY - Biochem. J. 111, 757 (1969)
25b I.A. WATKINSON et M. AKHTAR - Chem. Comm. 206 (1969)
25c M. AKHTAR, A.D. RAHIMTULA, I.A. WATKINSON, D.C. WILTON et K.A. MUNDAY - Europ. J. Biochem. 9, 107 (1969)
26. L. CANONICA, A. FIECCHI, M. GALLI-KIENLE, A. SCALLA, G. GALLI, E. GROSSI-PAOLET et R. PAOLETTI - J. Am. Chem. Soc. 90, 6532 (1968)
27a B.N. LUTZKY et G.J. SCHROEPFER,Jr. - Biochem. Biophys. Res. Comm. 33, 492 (1968
27b W.H.LEE et G.J. SCHROEPFER,Jr. - Biochem. Biophys. Res. Comm. 32, 635 (1968)
27c B.N. LUTZKY et G.J. SCHROEPFER,Jr. - Biochem. Biophys. Res. Comm. 35, 288 (1969
28. L.H. ZALKOW, G.A. CABAT et G.L. CHETTY - Tetrah. Lett. 5727 (1968)
29. S. RAKHIT, M.M. DHAR, N. ANAND et M.L. DHAR - J. Sci. and Ind. Res. 18B, 422 (1959)
30. A.C. SWINDELL et J.L. GAYLOR - J. Biol. Chem. 243, 5546 (1968)
31. A.A. KANDUTSCH et A.E. RUSSELL - J. Am. Chem. Soc. 81, 4114 (1959)
32. A. SANGHVI, D. BALASUBRAMANIAN et A. MOSCOWITZ - Biochem. 6, 869 (1967)
33. A. SANGHVI et I.D. FRANTZ,Jr. - Ph.D Thèse de A. SANGHVI, Univ. du Minnesota, Minneapolis 1966
34. J.St. PYRLK - Chem. Comm. 107 (1969)
35a K.B. SHARPLESS, T.E. SNYDER, T.A. SPENCER, K.K. MAHESWARI, G. GUHN et R.B. CLAYTON - J. Am. Chem. Soc. 90, 6874 (1968)
35b K.B. SHARPLESS, T.E. SNYDER, T.A. SPENCER, K.K. MAHESWARI, J.A. NELSON et R.B. CLAYTON - J. Am. Chem. Soc. 91, 3396 (1969)
36. I. SMEDLEY-MacLEAN - Biochem. J. 22, 92 (1928)
37. H.H. WIELAND et Y. KANAOKA - Annalen der Chemie 530, 146 (1937)
38. B. HEATH-BROWN, I.M. HEILBRON et E.R.H. JONES - J. Chem. Soc. 1482 (1940)
39. G.J. SCHROEPFER,Jr. - J. Biol. Chem. 236, 1668 (1961)
40. J.L. GAYLOR, C.V. DELWICHE et A.C. SWINDELL - Steroids 8, 353 (1966)
41. M. AKHTAR et A.D. RAHIMTULA - Chem. Comm. 259 (1968)
42. L. CANONICA, A. FIECCHI, M. GALLI-KIENLE, A. SCALLA, G. GALLI, E. GROSSI-PAOLET et R. PAOLETTI - a Steroids 11, 287 (1968)
b Steroids 12, 445 (1968)
43. G.F. GIBBONS, L.J. GOAD et T.W. GOODWIN - Chem. Comm. 1212 (1968)

44a E. CASPI, J.B. GREIG, P.J. RAMM et K.R. VARMA - Tetrah. Lett. 3829 (1968)

44b E. CASPI et P.J. RAMM - Tetrah. Lett. 181 (1969)

45. D. IDLER et C.A. BAUMANN - J. Biol. Chem. 195, 623 (1952)

46. I.D. FRANTZ,Jr., T.J. SCALLEN, A.N. NELSON et G.J. SCHROEPFER,Jr. - J. Biol. Chem. 241, 3818 (1966)

47. G.J. SCHROEPFER,Jr. et I.D. FRANTZ,Jr. - J. Biol. Chem. 236, 3137 (1961)

48. M.E.DEMPSEY, J.D. SEATON, G.J. SCHROEPFER,Jr. et R.W. TROCHMANN - J. Biol. Chem. 239, 1381 (1964)

49. L. KRAML, J.F. BAGLI et D. DVORNIK - Biochem. Biophys. Res. Comm. 15, 455 (1964)

50. A.A. KANDUTSCH - J. Biol. Chem. 237, 358 (1962)

51. R. NIEMIRO et R. FUNAGALLI - Biochem. Biophys. Acta 98, 624 (1965)

52. D. DVORNIK, M. KRAML et J.F. BAGLI - a Biochem. 5, 1060 (1966) et réf. citées
b J. Am. Chem. Soc. 86, 2739 (1964)

53a T.J. SCALLEN - Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, 149 (1965)

53b T.J. SCALLEN, W.J. DEAN, E.D. LOUGHRAN et B.V. VORA - J. Lipid Res. 10, 121 (196

54. A.R.H. SMITH, L.J. GOAD et T.J. GOODWIN - Chem. Comm. 1259 (1968)

55. A.M. PALIOKAS et G.J. SCHROEPFER,Jr. - J. Biol. Chem. 243, 453 (1968)

56a D.C. WILTON, M. AKHTAR et K.A. MUNDAY - Biochem. J. 98, 290 (1966)

56b D.C. WILTON, K.A. MUNDAY, S.J.M. SKINNER et M. AKHTAR - Biochem. J. 106, 803 (1968)

57. W.M. STOKES, W.A. FISH et F.C. HICKEY - a J. Biol. Chem. 220, 415 (1956)
b J. Biol. Chem. 232, 347 (1958)

58. W.M. STOKES et W.A. FISH - J. Biol. Chem. 235, 2604 (1960)

59. D. KRITCHEVSKY et W.L. HOLMES - Biochem. Biophys. Res. Comm. 7, 128 (1962)

60. M.E. SMITH - Life Science 6, 1085 (1967)

61a J. AVIGAN, D. STEINBERG, M. THOMPSON et E. MOSETTIG - Biochem. Biophys. Res. Comm. 2, 63 (1960)

61b J. AVIGAN, D. STEINBERG, H.J. VROMAN, M. THOMPSON et E. MOSETTIG - J. Biol. Chem. 235, 3123 (1960)

62. J.L. GAYLOR - Arch. Biophys. Bioch. 101, 108 (1963)

63. D. DVORNIK et M. KRAML - Proceed. Soc. Exper. Biol. Med. 112, 1012 (1963)

64a U.H.M. FAGERLUND et D.R. IDLER - J. Am. Chem. Soc. 79, 6473 (1957)

64b D.R. IDLER et P. WISEMAN - Comp. Biochem. Physiol. 26, 1113 (1968)

64c D.R. IDLER, A. SAITO et P. WISEMAN - Steroids 11, 465 (1968)

65. C. CHARLES, T. NJIMI, J.D. EHRHARDT, G. OURISSON, C. CONREUR, A. CAVE et R. GOUTAREL - Comp. Rend. Acad. Sciences, sous presse
66a A. ALCAIDE, M. DEVYS et M. BARBIER - F.E.B.S. Letters 3, 257 (1969)
66b A. ALCAIDE, M. DEVYS, J. BOTTIN, M. FETIZON, M. BARBIER et E. LEDERER - Phytochem. 7, 1773 (1968)
67. D.F. JOHNSON, R.D. BENNETT et E. HEFTMANN - Science 140, 198 (1963)
68. M. DEVYS et M. BARBIER - Comp. Rend. Acad. Sciences D 264, 504 (1967)
69. Y.S. CHEN et R.H. HASKINS - Canad. J. Chem. 41, 1647 (1963)
70. R.J. KEMP, A.S.A. HAMMAM, L.J. GOAD et T.W. GOODWIN - Phytochem. 7, 447 (1968)
71. T. TSUKAMOTO, A. YAGI, K. MIHASHI et Y. MORI - Chem. Pharm. Bull. 16, 2123 (1968
72. R. TSCHESCHE et H. HULPKE - Z. Naturf. 21b, 494 (1966)
73a R.D. BENNETT et E. HEFTMANN - Phytochem. 4, 577 (1965)
73b R.D. BENNETT et E. HEFTMANN - Phytochem. 5, 747 (1965)
74. E. CASPI, D.C. LEWIS, D.M. PIATAK, K.V. THIMANN et A. WINTER - Exper. 22, 506 (1966)
75. H. HIKINO T. KOHAMA et T. TAKEMOTO - Chem. Pharm. Bull. 17, 415 (1969)
76. M. CASTLE, G. BLONDIN et W.R. NES - J. Am. Chem. Soc. 85, 3306 (1963)
J. Biol. Chem. 242, 5796 (1967)
77. M. AKHTAR, P.F. HUNT et M.A. PARVEZ - Chem. Comm. 565 (1966)
78. L.J. GOAD, A.S.A. HAMMAM, A. DENNIS et T.W. GOODWIN - Nature 210, 1322 (1966)
79. K.H. RAAB, N.J. de SOUZA et W.R. NES - Biochem. Biophys. Acta 152, 742 (1968)
80. E. LEDERER - Experientia 20, 473 (1964)
81. M. LENFANT, R. ELLOUZ, B.C. DAS, E. ZISSMANN et E. LEDERER - Europ. J. Biochem. 7, 159 (1969)
82. M. DEVYS et M. BARBIER - Bull. Soc. Chim. Biol. 49, 865 (1967)
83. M.C. GERSHENGORN, A.R.H. SMITH, G. GOULSTON, L.J GOAD, T.W. GOODWIN et T.H. HAINES - Biochem. 7, 1698 (1968)
84. Z.F. AHMED, M.A. el-KEY, A.M. RIZK, F.M. HAMMOUDA et E.F. Abd-el-BARY - Planta Medica 16, 282 (1968)
85. N. de SOUZA et W.R. NES - Science 162, 363 (1968)
86. N. IKEKAWA, K.TSUDA et N. MORISAKI - Chem. and Indust. 1179 (1966)
87. W. SUCROW et A. REIMERDES - Z. Naturf. 23b, 42 (1968)
88. G. PONSINET et G. OURISSON - Phytochem. 4, 799 (1965)
89. S. UEYO, J. OKADA et S. MATSUNAGA - Tetrahedron 24, 2859 (1968)
90. W. LAWRIE, F.S. SPRING et H.S. WATSON - Chem. and Indust. 1458 (1956)

91. R.J. GAUTHERET - Comp. Rend. Acad. Sciences 208, 118 (1939)
La culture des tissus végétaux, Masson et Cie, PARIS 1959
92. Ph. R. WHITE - Am. J. Botany 26, 59 (1939)
93. L. HIRTH - Thèse, PARIS 1958
94. A. LUTZ - Thèse, STRASBOURG 1966
95. T. SPEAKE, P. McCLOSKY, W.K. SMITH, T.A. SCOTT et H. HUSSEN - Nature 201, 614 (1964)
96. T. FURUYA, H. KOJIMA et K. SYONO - Chem. Pharm. Bull. 14, 1189 (1966)
97. D.P. CAREW - Nature 207, 89 (1965)
98. B.M. SAYAGAVER, N.B. MULCHANDANI et S. NARAYANASWAMI - Lloydia, sous presse
99. H.R. HEBLE, S. NARAYANASWAMI et M.S. CHADHA - Naturwiss. 55, 350 (1968)
100a B. KAUL et E.J. STABA - Science 150, 1731 (1965)
100b S.A. BUCHNER et E.J. STABA - J. Pharm. Pharmacol. 16, 733 (1964)
100c W.-N. CHAN et E.J. STABA - Lloydia 28, 55 (1965)
100d E.J. STABA et P. LAURSEN - J. Pharm. Sciences 55, 1099 (1966)
100e B. KAUL et E.J. STABA - Lloydia 31, 171 (1968)
101. A.K. STOBART, N.R. WEIR et D.R. THOMAS - Phytochem. 8, 1089 (1969)
102. Y. TOMITA, A. UOMORI et H. MINATO - Phytochem., sous presse
103. A.J. ALLISON, D.N. BUTCHER, J.D. CONNOLLY et K.H. OVERTON - Chem. Comm. 1493 (1968)
104. U. GRABOW - Thèse, BERLIN 1968
105a P. BENVENISTE, A. DURR, L. HIRTH et G. OURISSON - Comp. Rend. Acad. Sciences 259, 2005 (1964)
105b P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON - Comp. Rend. Acad. Sciences 259, 2284 (1964)
105c P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON - Phytochem. 5, 31 (1966)
105d P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON - Comp. Rend. Acad. Sciences D 265, 1749 (1967)
105e P. BENVENISTE et R.A. MASSY-WESTROPP - Tetrah. Letters 3553 (1967)
105f P. BENVENISTE - Phytochem. 7, 951 (1968)
106. M. LINDBERG, F. GAUTSCHI et K. BLOCH - J. Biol. Chem. 238, 1661 (1963)
107. J. HALL, A.R.H. SMITH, L.J. GOAD et T.W. GOODWIN - Biochem. J. 112, 129 (1969)
108. M. DEVYS, A. ALCAIDE et M. BARBIER - Bull. Soc. Chim. Biol. 51, 133 (1969)
109. M. AKHTAR et M.A. PARVEZ - Biochem. J. 108, 527 (1968)
110. S.M. DEWHURST et M. AKHTAR - Biochem. J. 105, 1187 (1967)

111. G.J. SCHROEPFER,Jr. et I.D. FRANTZ,Jr. - J. Biol. Chem. 236, 3137 (1961)
112. M.J. THOMPSON, J. DUPONT et W.E. ROBBINS - Steroids 2, 99 (1963)
113. K. IRMSCHER, J.M. KRAEMER et H. HALPAAP - Steroids 7, 557 (1966)
114. J. POTTIER - Clin. Chim. Acta 13, 341 (1966)
115. J.L. GAYLOR - Arch. Biophys. Bioch. 101, 409 (1963)
116. J. BONNER, E. HEFTMANN et J.A.D. ZEEVAART - Plant Physiol. 38, 81 (1963)
117. D.T. DENNIS et C.A. WEST - J. Biol. Chem. 242, 3293 (1967)
118. G. DEYSSON et M.C. BENBADIS - Comp. Rend. Acad. Sciences 260, 2289 (1965)
119. M.L. GIVNER, J.G. ROCHEFORT et D. DVORNIK - Endocrinology 81, 976 (1967)
120. P. HILL et J.G. ROCHEFORT - Canad. J. Biochem. 44, 1239 (1966)
121. M.DEVYS, A. ALCAIDE et M. BARBIER - Bull. Soc. Chim. Biol. 50, 1751 (1968)
122. L. RUZICKA - Experientia 9, 357 (1953)
123. R.B. WOODWARD et K. BLOCH - J. Am. Chem. Soc. 75, 2023 (1953)
124. H.H. REES, L.J. GOAD et T.W. GOODWIN - Biochem. J. 107, 417 (1968)
125. D. HERLEM-GAULIER, F. KHUONG-HUU-LAINE et R. GOUTAREL - Bull. Soc. Chim. France 763 (1968)
126. D. STAUFFACHER - Helv. Chim. Acta 47, 968 (1964)
127. K.S. BROWN et S.M. KUPCHAN - Tetrah. Letters 2895 (1964)
128. S.M. KUPCHAN et E. KUROSAWA - J. Org. Chem. 30, 2046 (1965)
129. R.T. PUCKETT, G.A. SIM, E. ABUSHANAB et S.M. KUPCHAN - Tetrah. Letters 3815 (1966)
130. Z. VOTICKY et J. TOMKO - Coll. Czech. Chem. Comm. 30, 348 (1965)
131. S. AARONSON - J. Gener. Microbiol. 39, 367 (1965)
132. L.F. FIESER and M. FIESER - Steroids, p. 116, REINHOLD (1959)

APPENDICE

REFERENCES RELATIVES AU TABLEAU V

1. L.J. GOAD et T.W. GOODWIN - Biochem. J. 99, 735 (1966)
2. A. ALCAIDE, M. DEVYS et M. BARBIER - Phytochem. 7, 329 (1968)
3. C. GERSHENGORN, A.R.H. SMITH, G. GOULSTON, L.J. GOAD, T.W. GOODWIN et T.H. HAINES -Biochemistry 7, 1698 (1968)
4. G.F. GIBBONS, L.J. GOAD et T.W. GOODWIN - Phytochem. 7, 903 (1968)
5. G. BERTI, F. BOTTARI, B MACCHIA, A. MARSILI, G. OURISSON et H. PIOTROWSKA - Bull. Soc. Chim. France 2359 (1964)
6. G. BERTI, F. BOTTARI, A. MARSILI, I. MORELLI, M. POLVANI et A. MANDELBAUM - Tetrah. Lett. 125 (1967)
7. L.J. GOAD et T.W. GOODWIN - Europ. J. Biochem. 1, 357 (1967)
8. J.D. EHRHARDT, L. HIRTH et G. OURISSON - Phytochem. 6, 815 (1967)
9. R. McCRINDLE et C. DJERASSI - Chem. and Indust. 1311 (1961)
   C. DJERASSI et R. McCRINDLE - J. Chem. Soc. 4034 (1962)
10. G. OHTA et M. SHIMIZU - Chem. Pharm. Bull. 5, 40 (1957)
    G. OHTA et M. SHIMIZU - Chem. Pharm. Bull. 6, 325 (1967)
    G. OHTA - Chem. Pharm. Bull. 8, 5,108 (1960)
    M. SHIMIZU, F. UCHIMARU et G. OHTA - Chem. Pharm. Bull. 12, 74 (1964)
11. E. FEDELI, A. LANZANI, P. CAPELLA et G. JACINI - J. Am. Oil Chem. Soc. 254 (196
12. R.J. KEMP, A.S.A. MAHMAN, L.J. GOAD et T.W. GOODWIN - Phytochem. 7, 447 (1968)
13. H. PINHAS - Bull. Soc. Chim. France 2037 (1969)
14. K.N.N. AYENGAR et S. RANGASWAMI - Tetrah. Lett. 3567 (1967)
15. F.F. KNAPP et H.J. NICHOLAS - Phytochem. 8, 207 (1969)
16. S. CORSANO et F. MINCIONE - Chem. Abstr. 66, 11062 (1967)
    68, 13209 (1968)
    Chem. Comm. 738 (1968)
    S. CORSANO et G. PIANCATELLI - Chem. Abstr. 63, 18181 (1965)
    Tetrah. Lett. 2377 (1965)
17. C. TABACIK-WLOTZKA, J.L. IMBERT et P. PISTRE - Comp. Rend. Acad. Sciences D 265, 708 (1967)
18. G. CHARLES, N. NJIMI, J.D. EHRHARDT, G. OURISSON, C. CONREUR, A. CAVE et R. GOUTAREL - Comp. Rend. Acad. Sciences, sous presse
19. K. JEWERS, A.H. MANCHADA et R.T. APLIN - Phytochem., sous presse

20. J. BERGMANN, B.O. LINDGREEN et C.M. SVAHN - Acta Chem. Scand. 19, 1661 (1965)
21. M. DEVYS et M. BARBIER - Bull. Soc. Chim. Biol. 49, 865 (1967)
22. T. TAMURA, S. TAMAI et T. MATSUMOTO - Chem. Abstr. 54, 23372 (1960)
23. A. RUTKOWSKI, G. JACINI, P. CAPELLA et M. CIRIMELE - Chem. Abstr. 65, 12428 (196
24. R. LUDWICZAK - Comm. personn.
25. S. CHAPON et S. DAVID - Bull. Soc. Chim. France 456 (1952)
A.G. GONZALEZ et J.L. BRETON - Chem. Abstr. 48, 7040 (1954)
A.G. GONZALEZ, J.L. BRETON et C. BRETON - Chem. and Indust. 416 (1955)
A.G. GONZALEZ, J.L. BRETON-FUNES et A. GARCIA-PADRON - Chem. Abstr. 53, 9373 (1957)
A.G. GONZALEZ - Chem. Abstr. 60, 5585 (1966)
T. TAKEMOTO, Y. KONDO et T. ISHIGURO - Chem. Abstr. 65, 10964 (1966)
A.N. STARRAT - Phytochem. 5, 1341 (1966)
A.N. STARRAT - Phytochem. 8, 795 (1969)
MUHAMMAD NAZIR, NAEMUDDIN, IFTIKHAR AHMAD, S.A. KAHN, M.K. BHATTY et KARIMULLAH Chem. Abstr. 64, 13089 (1965)
G. PONSINET et G. OURISSON - Phytochem. 6, 1235 (1967)
D.J. BAISTED, R.L. GARDNER et L.A. McREYNOLDS - Phytochem. 7, 945 (1968)
D. LAVIE, M.K. JAIN et T.O. ORLBAMJO - Phytochem. 7, 657 (1968)
26. G. PONSINET et G. OURISSON - Phytochem. 4, 813 (1965)
27. R.T. APLIN, J.H.C. BLASDALE, T.G. HALSALL et G.M. HORNBY - J. Chem. Soc. C 247 (1967)
28. C. PAQUOT et M. TASSEL - Oléagineux 21, 453 (1966)
29. M. WALBECQ - Revue Franç. des Corps Gras 13, 101 (1966)
30. P. CAPELLA - Nature 190, 167 (1961)
31. H.R. BENTLEY, J.A. HENRY, D.S. IRVINE et F.S. SPRING - Chem. and Ind. 217 (1953) J. Chem. Soc. 3673 (1953)
32. L. AMOROS-MARIN, W.I. TORRES et C.F. ASENJO - J. Org. Chem. 24, 411 (1959)
33. D.H.R. BARTON - J. Chem. Soc. 1444 (1951)
34. M.N. GALBRAITH, C.J. MILLER, J.W.L. RAWSON, E. RITCHIE, J.P. SHANNON et W.C. TAYLOR - Austr. J. Chem. 18, 226 (1965)
E. RITCHIE, M.N. GALBRAITH, C.J. MILLER, J.W.L. RAWSON et W.C. TAYLOR - Coll. Internat. C.N.R.S. 144, 107 (1966)
35. W. COCKER, T.B.H. MARTIN et M.S. NTAMILA - J. Chem. Soc. 1692 (1965)
36. E. RITCHIE, D. SNAPE et W.C. TAYLOR - Austr. J. Chem. 14, 471 (1961)
37. J.S.G. COX, F.E. KING et T.J. KING - J. Chem. Soc. 1384 (1956)
38. K.MATSUI, J. AKAGI et F. UGAI - Chem. Pharm. Bull. 10, 872 (1962)

39. H.R. BENTLEY, J.A. HENRY, D.S. IRVINE, D. MUCKERJI et F.S. SPRING - J. Chem. Soc. 596 (1955)

40. B. DROZDZ et Z. KOWALEWSKI - Dissert. Pharm. 17, 527 (1967)

41. S. CORSANO, J. MELLOR et G. OURISSON - Chem. Comm. 185 (1965)

42. M. DEVYS et L. BARBIER - Comp. Rend. Acad. Sciences D 264, 504 (1967)

43. B.L. WILLIAMS, L.J. GOAD et E.I. MERCER - Biochem. J. 96, 31P (1965)

44. L.J. GOAD, B.L. WILLIAMS et T.W. GOODWIN - Europ. J. Biochem. 3, 232 (1967)

45. B.L. WILLIAMS, L.J. GOAD et T.W. GOODWIN - Phytochem. 6, 1137 (1967)

46. R.A. ABRAMOVITCH et R.C. MICETICH - Chem. Abstr. 59, 8809 (1963)

47. B.O. LINDGREEN et C.M. SVAHN - Acta Chem. Scand. 20, 1763 (1966)

48. W. COCKER et S.J. SHAW - J. Chem. Soc. 677 (1963)

49. K. SCHREIBER et G. OSSKE - die Kulturpflanze 10, 372 (1962)
Experientia 19, 69 (1961)

50. M. von ARDENNE, K. STEINFELDER, R. TUMMLER, G. OSSKE et K. SCHREIBER - die Kulturpflanze 13, 101,115 (1963)

51. M.J. BERNARD et W.J. REID - Chem. and Industr. 997 (1967)

52. P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON - Phytochem. 5, 41 (1966)

53. P. BENVENISTE - Phytochem. 7, 951 (1968)

54. H. CHAVLRON - Choc. Confiserie Franç. 222, 25 (1966)

55. J.D. EHRHARDT - Résultats non publiés

56. R. GOUTAREL et coll. - Bull. Soc. Chim. France 657 (1965)
758, 1216, 3478 (1966)
763 (1968)

57. F. KHUONG-HUU LAINE, D. HENLEL-GAULIER, QU. KHUONG-HUU, E. STANISLAS et R. GOUTAREL - Tetrahedron 22, 3321 (1966)

58. T. NAKANO et coll. - J. Chem. Soc. 4512, 6688 (1965)
C 1412 (1966)

59. W. DOEPKE et coll. - Pharmazie 22, 666 (1967)
23, 37 (1967)
Tetrah. Lett. 4247 (1967)

60. R.C. CAMBIE - Comm. personn.

TABLE DES MATIERES

		Page
INTRODUCTION	.....	1
CHAPITRE I.	-Recherche du cycloarténol et du lanostérol dans diverses espèces végétales.....	14
CHAPITRE II.	-Incorporation de cycloarténol et de lanostérol dans les tissus de tabac cultivés *in vitro*.	27
CHAPITRE III.	-Action du produit "AY-9944" sur la biosynthèse des phytostérols des tissus de tabac cultivés *in vitro*.	41
CONCLUSION	.....	51
BIBLIOGRAPHIE	.....	55
APPENDICE	.....	61

Strasbourg, le 10.10.1969
Le Président du Jury,

G. OURISSON

VU et Permis d'imprimer
Strasbourg, le 20 octobre 1969

LE DOYEN

J.H. VIVIEN